



# Synthèse et études physico-chimiques de verres bioactifs denses et poreux.Applications en tant que biomatériaux en sites osseux.

Elodie Dietrich

## ► To cite this version:

Elodie Dietrich. Synthèse et études physico-chimiques de verres bioactifs denses et poreux.Applications en tant que biomatériaux en sites osseux.. Matériaux. Université Rennes 1, 2008. Français. NNT : . tel-00344630

**HAL Id: tel-00344630**

**<https://theses.hal.science/tel-00344630>**

Submitted on 5 Dec 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'Ordre : 3767

# THESE

*présentée devant*

**L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

*pour obtenir*

Le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE DE RENNES 1  
Mention CHIMIE

*par*

**Elodie DIETRICH**

Equipe d'accueil : Chimie du Solide et Matériaux  
UMR CNRS 6226 Sciences Chimiques de Rennes  
Ecole doctorale : Sciences de la Matière  
Composante Universitaire : SPM

**Synthèse et études physico-chimiques  
de verres bioactifs denses et poreux. Applications en  
tant que biomatériaux en sites osseux.**

*Soutenue le 17 octobre 2008 devant la commission d'Examen*

## COMPOSITION DU JURY :

<b>Rapporteurs</b>	G. BALOSSIER	Professeur à l'Université de Reims
	P. SHARROCK	Professeur à l'IUT de Castres Université Paul Sabatier de Toulouse
<b>Examineurs</b>	B. BUREAU	Professeur à l'Université de Rennes 1
	T. GLORANT	Professeur à l'INSA de Rennes
	S. JEANNE	Maître de conférence à l'Université de Rennes 1
	H. OUDADESSE	Professeur à l'Université de Rennes 1, directeur de thèse



*Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir.  
Autrement dit : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche.*

Les Shadoks





# **REMERCIEMENTS**

*Mes premiers remerciements vont à Monsieur Jean-Yves Saillard, directeur de l'UMR-CNRS 6226 Sciences Chimiques de Rennes, et Madame Maryline Guilloux-Viry, responsable de l'équipe Chimie du Solide et Matériaux, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire pendant la durée de ma thèse.*

*Je tiens ensuite à remercier le directeur de cette thèse, Monsieur Hassane Oudadesse, pour m'avoir fait confiance et pour la grande liberté dont j'ai bénéficié pendant ces trois années.*

*Je remercie Messieurs Gérard Balossier et Patrick Sharrock d'avoir accepté de rapporter ce travail et Madame Sylvie Jeanne, ainsi que Messieurs Bruno Bureau et Thierry Gloriant d'avoir accepté d'être membres du jury.*

*J'exprime mes plus sincères remerciements à Anita Lucas-Girot et Yann Le Gal, membres de l'équipe Biomatériaux, pour tous les bons moments passés ensemble, leur bonne humeur et surtout leurs conseils avisés. Merci également à Guy Cathelineau et Pascal Pellen, grâce à qui les études biologiques ont pu être réalisées.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Marie Le Floch pour sa gentillesse et sa disponibilité lors des analyses RMN ; sans elle, les spectres obtenus auraient été beaucoup moins nombreux. Merci également à Bruno Bureau pour son aide lors de l'interprétation des spectres.*

*Je tiens à remercier Thierry Gloriant et Denis Laillé de l'INSA de Rennes pour les analyses par DRX, ainsi que l'ensemble de l'équipe Chimie-Métallurgie, et en particulier Denis Ansel et Doïna Gordin, pour leur sympathie.*

*Je remercie Joseph Le Lannic, Sandra Casale, Isabelle Perron et Caroline Leynia de la Jarrige du CMEBA pour les observations et analyses au microscope électronique à balayage. Je leur dois les nombreuses images qui figurent dans cette thèse.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Laura-Mary Epure et L'Hocine Yahia pour leur accueil lors de mon stage de recherche à l'Ecole Polytechnique de Montréal. Merci également au Docteur Yahye Mehri pour m'avoir permis d'effectuer les tests biologiques dans son laboratoire de l'Institut de Cardiologie de Montréal.*

*Je remercie également tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est, notamment pour les discussions que j'ai pu avoir avec eux. Je pense ici en particulier à Jean-Christophe Sangleboeuf, pour ses bonnes idées et sa disponibilité, ainsi que Jean Rocherullé et Ronan Lebullenger, pour leurs suggestions sur les verres.*

*Je tiens à remercier Christophe Derouet, pour son soutien technique et les nombreux moules qu'il a fabriqué à ma demande, ainsi que Richard André. Merci également à l'ensemble des membres de l'équipe Chimie du Solide et Matériaux.*

*Je suis également très heureuse d'avoir partagé le bureau 118 pendant ces trois années avec Mohamed et Fatima, doctorants, et avec les nombreux stagiaires : Sébastien, Hubert, Nour-El-Aïne, Yu, Franck, Buy et Gwenaël.*

*J'exprime toute mon amitié à Nathalie Audebrand et aux garçons : Stéphane Golhen, Olivier Cador et Fabrice Pointillart pour les excellents moments passés ensemble.*

*Un très grand merci à Thomas, pour m'avoir soutenu et avoir partagé mon quotidien pendant cette dernière année de thèse. Merci à Xavier, Clémence, Quentin, Julie, Victor, Marina et Matthieu, tous doctorants en chimie, mais avant tout des amis exceptionnels, pleins de bonne humeur et de sympathie !*

*Enfin, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien et leur présence ; sans eux, je ne serais pas aller si loin ! Je terminerai en remerciant mon frère et ma belle-sœur ; grâce à eux, j'ai eu la joie de devenir tatie de deux adorables petites filles, Faustine et Léonore, durant cette thèse !*

# Sommaire

## Introduction.....7

## Partie 1 Etude bibliographique.....13

### Chapitre Premier Les biomatériaux.....15

1. Les biomatériaux de comblement osseux.....	15
1.1. Définition générale des biomatériaux.....	15
1.2. Les biomatériaux d'origine naturelle : les greffes osseuses.....	16
1.3. Quelques biomatériaux synthétiques de comblement osseux.....	17
1.3.1. Les céramiques phosphocalciques.....	17
1.3.2. Le carbonate de calcium naturel ou synthétique.....	19
1.3.3. Les composites géopolymères – phosphate de calcium.....	19
2. Propriétés et classification des biomatériaux.....	20
2.1. Biocompatibilité d'un matériau.....	20
2.2. Classification des biomatériaux en fonction de l'interface formée avec les tissus.....	21
2.3. Optimisation d'un biomatériau pour une application en tant que matériau de comblement ou substitut osseux.....	22
2.3.1. Description du tissu osseux.....	23
2.3.2. Propriétés mécaniques.....	24
3. Intérêt physiologique de certains éléments chimiques.....	25

### Chapitre 2 Les verres bioactifs.....29

1. Généralités sur le verre.....	29
1.1. Définition.....	29
1.2. Propriétés du verre.....	30
1.3. Méthodes de synthèse du verre.....	34
1.3.1. Synthèse par fusion.....	34
1.3.2. Synthèse par voie sol-gel.....	35
2. Notion de bioactivité et de réactivité chimique.....	36
3. Réactions à l'interface verre bioactif – tissus osseux.....	38

## Partie 2 Matériaux et méthodes expérimentales.....41

### Chapitre 3 Techniques expérimentales.....43

1. Analyses thermiques.....	43
1.1. Principe.....	43
1.2. Protocole expérimental.....	44
2. Diffraction des rayons X.....	44
2.1. Principe.....	44
2.2. Protocole expérimental.....	45

3. Spectroscopie d'absorption infrarouge.....	45
3.1. Principe.....	45
3.2. Protocole expérimental.....	46
4. Microscopie électronique à balayage.....	46
4.1. Principe.....	46
4.2. Protocole expérimental.....	47
5. Spectrométrie d'émission optique.....	48
5.1. Principe.....	48
5.2. Protocole expérimental.....	49
6. Résonance magnétique nucléaire.....	49
6.1. Principe.....	49
6.2. Protocole expérimental.....	51
<b>Chapitre 4 Synthèse et caractérisations des verres bioactifs purs et dopés.....</b>	<b>53</b>
1. Synthèse par fusion des verres bioactifs.....	53
1.1. Choix des compositions et des éléments introduits.....	53
1.2. Protocole de synthèse.....	55
2. Caractérisations des verres bioactifs synthétisés par : .....	56
2.1. Analyse thermique différentielle.....	56
2.2. Diffraction des rayons X.....	58
2.3. Spectroscopie d'absorption infrarouge.....	59
2.4. Etudes des verres synthétisés par MEB couplé à l'EDS.....	61
3. Bilan des résultats.....	63
<b>Chapitre 5 Etude <i>in vitro</i> des verres en l'absence de cellules</b>	
<b>Protocole expérimental.....</b>	<b>65</b>
1. Choix du milieu utilisé.....	65
1.1. Intérêt des tests <i>in vitro</i> .....	65
1.2. Présentation du SBF.....	66
2. Protocole expérimental.....	67
2.1. Préparation des échantillons.....	67
2.2. Immersion des échantillons.....	68
2.2.1. Pastilles de verres bioactifs.....	68
2.2.2. Poudres de verres bioactifs.....	68
<b>Partie 3 Etude <i>in vitro</i>. Interactions verres bioactifs – milieu</b>	
<b>physiologique synthétique.....</b>	<b>69</b>
<b>Chapitre 6 Etude de la bioactivité du 46S6.....</b>	<b>71</b>
1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre 46S6 après immersion dans le SBF.....	71
1.1. Analyse des surfaces par DRX.....	71
1.2. Analyse de la couche formée par FTIR.....	73
1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion.....	75
2. Evolution de la composition du SBF lors des tests <i>in vitro</i> .....	78
3. Résumé des observations pour le verre pur 46S6.....	80

<b>Chapitre 7 Etude de la bioactivité du 46S6 dopé au magnésium.....</b>	<b>81</b>
1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre dopé au magnésium après immersion dans le SBF.....	81
1.1. Analyse des surfaces par DRX.....	81
1.2. Analyse de la couche formée par FTIR.....	82
1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion.....	84
2. Effet du magnésium la composition du SBF lors des tests <i>in vitro</i> .....	89
3. Résumé des observations pour les verres dopés au magnésium.....	91
<b>Chapitre 8 Etude de la bioactivité du 46S6 dopé au zinc.....</b>	<b>93</b>
1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre dopé au zinc après immersion dans le SBF.....	93
1.1. Analyse des surfaces par DRX.....	93
1.2. Analyse de la couche formée par FTIR.....	94
1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion.....	96
2. Effet du zinc sur la composition du SBF lors des tests <i>in vitro</i> .....	100
3. Résumé des observations pour les verres dopés au zinc.....	103
<b>Chapitre 9 Etude de la bioactivité du 46S6 dopé au strontium.....</b>	<b>105</b>
1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre dopé au strontium après immersion dans le SBF.....	105
1.1. Analyse des surfaces par DRX.....	105
1.2. Analyse de la couche formée par FTIR.....	106
1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion.....	108
2. Effet du strontium sur la composition du SBF lors des tests <i>in vitro</i> .....	113
3. Résumé des observations pour les verres dopés au strontium.....	115
<b>Chapitre 10 Influence de l'introduction des trois éléments dopants simultanément.....</b>	<b>117</b>
1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre 46S6 dopé avec 3 éléments simultanément après immersion dans le SBF.....	117
1.1. Analyse des surfaces par DRX.....	117
1.2. Analyse de la couche formée par FTIR.....	119
1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion.....	120
2. Effets des éléments dopants sur la composition du SBF lors des tests <i>in vitro</i> .....	128
2.1. Immersion des échantillons de verre 46S6 Os.....	128
2.2. Immersion des échantillons de verre 46S6 Sup.....	130
3. Résumé des observations pour les verres dopés avec 3 éléments simultanément.....	132
<b>Chapitre 11 Discussion sur les interactions verres bioactifs – SBF.....</b>	<b>133</b>
1. Bilan des interactions à l'interface verre bioactif – SBF.....	133
2. Influence du magnésium sur les interactions verre bioactif – SBF.....	136
3. Influence du zinc sur les interactions verre bioactif – SBF.....	138
4. Influence du strontium sur les interactions verre bioactif – SBF.....	140
5. Influence des 3 éléments introduits simultanément sur les interactions verre bioactif – SBF.....	142

## **Partie 4 Etude structurale par RMN du solide des verres bioactifs...145**

### **Chapitre 12 Influence des éléments introduits sur le réseau vitreux.....147**

1. Intérêt de l'étude des verres par RMN-MAS du solide.....	147
2. Etude de la structure du 46S6.....	149
2.1. Etude par RMN-MAS $^{29}\text{Si}$ du 46S6.....	149
2.2. Etude par RMN-MAS $^{31}\text{P}$ du 46S6.....	150
2.3. Validation de la structure.....	152
3. Etude de la structure des verres dopés.....	153
3.1. Etude par RMN-MAS $^{29}\text{Si}$ .....	153
3.2. Etude par RMN-MAS $^{31}\text{P}$ .....	156
4. Influence des éléments introduits sur le réseau vitreux.....	159

### **Chapitre 13 Modifications structurales des verres lors des tests *in vitro*.....161**

1. Originalité de l'étude de la structure des verres après immersion.....	161
2. Evolution de la structure du 46S6 lors des tests <i>in vitro</i> .....	162
2.1. Etude par RMN-MAS $^{29}\text{Si}$ du 46S6.....	162
2.2. Etude par RMN-MAS $^{31}\text{P}$ du 46S6.....	165
3. Influence des éléments introduits sur l'évolution de la structure lors des tests <i>in vitro</i> .....	168
3.1. Etude par RMN-MAS $^{29}\text{Si}$ .....	168
3.2. Etude par RMN-MAS $^{31}\text{P}$ .....	172
4. Bilan des modifications structurales lors des tests <i>in vitro</i> .....	175

### **Chapitre 14 Analyses des échantillons sur poudre après immersion.....177**

1. Analyse par ICP-OES du SBF après immersion.....	177
2. Caractérisations des poudres après immersion.....	182
2.1. Analyse par spectroscopie d'absorption infrarouge.....	182
2.2. Observation de la surface des poudres par MEB.....	184
3. Bilan des résultats obtenus et intérêt de l'étude sur poudre.....	187

## **Partie 5 Etudes biologiques.....189**

### **Chapitre 15 Evaluation *in vitro* des verres en présence de cellules.....191**

A. Etude réalisée sur matériaux massifs.....	191
1. Evaluation de la cytotoxicité des verres bioactifs – Tests préliminaires sur poudres.....	191
1.1. Protocole expérimental.....	192
1.1.1. Méthode de stérilisation.....	192
1.1.2. Méthode d'extraction.....	192
1.1.3. Lignées cellulaires.....	193
1.1.4. Test MTT.....	193
1.2. Résultats des tests MTT.....	194
2. Evaluation de la prolifération cellulaire à la surface des verres.....	198
2.1. Protocole expérimental.....	198
2.1.1 Préparation des échantillons.....	198
2.1.2. Test Alamar Blue.....	198
2.2. Résultats du test Alamar Blue 3.....	200
B. Etude réalisée sur poudres.....	202
3. Evaluation de la cytotoxicité et de la prolifération cellulaire.....	202

3.1. Protocole expérimental.....	202
3.1.1. Lignées cellulaires.....	202
3.1.2. Méthode d'extraction.....	203
3.1.3. Test à la SulfoRhodamine B (SRB).....	203
3.2. Résultats du test SRB.....	204
3.3. Discussion des résultats.....	209
 <b>Partie 6     Autres formes d'utilisation des verres bioactifs.....</b>	<b>211</b>
 <b>Chapitre 16   Elaboration de phosphosilicates poreux à base de verre.....</b>	<b>213</b>
1. Le phénomène d'expansion.....	213
1.1. Principe de la méthode.....	213
1.2. Choix des nitrures utilisés.....	215
2. Protocole expérimental.....	217
3. Essais d'expansion.....	218
3.1. Expansion à partir de nitrure d'aluminium AlN.....	218
3.2. Expansion à partir de nitrure de titane TiN.....	219
 <b>Chapitre 17   Matériaux poreux obtenus avec le nitrure d'aluminium.....</b>	<b>221</b>
1. Optimisation des paramètres de synthèse.....	221
1.1. Températures caractéristiques.....	221
1.2. Etude de la morphologie des matériaux synthétisés.....	222
1.2.1. Influence de la température de réaction.....	222
1.2.2. Influence de la durée du palier de réaction.....	224
2. Caractérisations physico-chimiques des échantillons.....	226
2.1. Diffraction des rayons X.....	226
2.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge.....	229
2.3. Analyse EDS.....	230
2.4. Etude structurale par RMN du solide.....	231
3. Etude après immersion dans le SBF.....	234
3.1. Analyse du SBF par ICP-OES.....	234
3.2. Evolution de la morphologie des échantillons.....	235
3.2.1. Observation des surfaces par MEB.....	235
3.2.2. Analyse de la surface des matériaux par EDS.....	237
4. Bilan de cette étude.....	238
 <b>Chapitre 18   Matériaux poreux obtenus avec le nitrure de titane.....</b>	<b>241</b>
1. Optimisation des paramètres de synthèse.....	241
1.1. Températures caractéristiques.....	241
1.2. Etude de la morphologie des matériaux synthétisés.....	242
1.2.1. Influence de la température de réaction.....	242
1.2.2. Influence de la durée du palier de réaction.....	243
2. Caractérisations physico-chimiques des échantillons.....	244
2.1. Diffraction des rayons X.....	244
2.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge.....	245
2.3. Observation du matériau et évaluation de la taille des pores.....	246
3. Bilan de cette étude.....	249



<b>Chapitre 19 Revêtements d'alliages de titane en verre bioactif.....</b>	<b>251</b>
1. Le revêtement par dip-coating.....	251
1.1. Choix de la méthode de revêtement.....	251
1.2. Critères d'utilisation de cette méthode.....	252
2. Protocole expérimental.....	253
2.1. Synthèse et préparation des verres.....	253
2.2. Préparation des alliages de titane.....	254
2.3. Dépôt des revêtements en verres bioactifs.....	255
3. Résultats préliminaires à cette étude.....	255
3.1. Caractérisation du verre 57S6.....	255
3.2. Caractérisation des alliages de titane.....	257
3.3. Premiers revêtements.....	258
 <b>Conclusion générale.....</b>	 <b>259</b>
 <b>Références.....</b>	 <b>265</b>
 <b>Annexes.....</b>	 <b>281</b>
Annexe 1 : Théorie élémentaire de la spectroscopie d'absorption IR.....	283
Annexe 2 : Rayonnements émis par les atomes sous un faisceau d'électrons.....	285
Annexe 3 : Résonance magnétique nucléaire.....	287
Annexe 4 : Protocole de synthèse du SBF.....	289

# INTRODUCTION



## Introduction

Le squelette osseux, qui constitue la charpente du corps humain, peut subir des fractures ou des pertes de substance. Ces pertes, induites par des traumatismes ou par certaines pathologies, peuvent ainsi altérer une ou plusieurs fonctions du tissu osseux. Les chirurgiens tentent de remédier à ces problèmes par une reconstruction ou un remplacement du site osseux endommagé. A ces fins, les matériaux de substitution d'origine synthétique sont de plus en plus sollicités, car ils présentent une sécurité clinique que ne peuvent offrir les greffes osseuses naturelles. Ces derniers doivent être biocompatibles et dotés de propriétés mécaniques et physico-chimiques leur permettant d'éviter tout risque d'intolérance ou de rejet par l'organisme.

Ces dernières années, d'importants progrès ont été réalisés concernant la conception et le développement de nouveaux biomatériaux de substitution osseuse. Les biomatériaux de nouvelle génération sont désormais capables de se lier au tissu osseux, de stimuler son processus de régénération ou encore de servir de support de molécules. Chirurgiens, chimistes, biologistes et physiciens travaillent ainsi en étroite collaboration sur cette nouvelle génération de biomatériaux qui permettra à la médecine de continuer à progresser dans le domaine des substituts osseux.

Le présent travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe Chimie du Solide et Matériaux - Biomateriaux de l'UMR-CNRS 6226 Sciences Chimiques de Rennes, à l'Université de Rennes 1 et sous la direction du professeur Hassane Oudadesse. Ce travail intervient après diverses études sur les biomatériaux de comblement osseux menées au laboratoire et s'inscrit dans une thématique de recherche pluridisciplinaire. Son sujet a porté sur l'élaboration, l'étude physico-chimique et l'évaluation biologique de verres bioactifs purs et dopés, sous forme massive ou poreuse.

Une fois en contact avec les fluides biologiques, les verres bioactifs présentent la particularité d'engendrer une série de réactions physico-chimiques à l'interface verre-tissus osseux. Cette série de réactions constitue le mécanisme de bioactivité et aboutit à la formation d'une couche de phosphate de calcium. Par la suite, cette couche cristallise pour former une phase similaire à la phase minérale majoritaire de l'os : l'hydroxyapatite. L'intérêt des verres bioactifs en tant que comblement ou substitut osseux réside dans la formation de cette couche. En effet, la formation d'hydroxyapatite permet la création de liaisons intimes entre l'implant et les tissus osseux, ce qui à terme favorise la bioconsolidation et la repousse osseuse. Cette bioactivité du matériau s'avère donc particulièrement intéressante pour des applications en tant que comblement ou substitut osseux, ainsi que revêtement prothétique, en chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale.

Dans un premier temps, les objectifs de cette thèse ont porté sur la mise en place de l'étude des verres bioactifs au sein du laboratoire. La synthèse des verres par fusion à haute température a été développée et différents éléments dopants ont été introduits dans la matrice des verres. Les premiers essais *in vitro* ont été réalisés et ont permis la validation des protocoles expérimentaux.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence des éléments introduits dans la matrice vitreuse sur la réactivité chimique des verres et sur le processus de bioactivité lors de tests *in vitro* en milieu physiologique simulé. Lors de cette étude, la surface des verres après immersion a été étudiée par différentes méthodes de caractérisations physico-chimiques et le milieu d'immersion a été analysé par ICP-OES, afin de quantifier les échanges ioniques ayant eu lieu entre le verre et le milieu. Les résultats nous ont amené à approfondir notre compréhension des phénomènes observés, par le biais d'une étude structurale des verres, avant et après immersion, par RMN du Solide. Les résultats ainsi obtenus constituent une approche originale de l'étude de la réactivité chimique des verres et du processus de bioactivité. En parallèle avec l'étude *in vitro* en milieu physiologique simulé, des études *in vitro* en milieu cellulaire ont été réalisées. Ces études ont permis de mettre en évidence la non-cytotoxicité de nos matériaux et d'évaluer la prolifération cellulaire à leur surface. Ces études se sont déroulées en deux temps : une première partie a été menée dans le cadre d'une collaboration avec l'Ecole Polytechnique de Montréal et la seconde partie a été effectuée par les biologistes de notre équipe, à l'UFR d'Odontologie de l'Université de Rennes 1.

Dans un dernier temps, nous nous sommes attachés à développer des biomatériaux poreux par une voie de synthèse originale. En effet, pour certaines applications médicales, la porosité est une propriété recherchée afin de permettre une vascularisation, ainsi qu'une cohésion et une colonisation de l'implant par l'os.

Cette thèse est organisée en six parties distinctes.

La première partie porte sur des considérations générales sur les biomatériaux et leurs propriétés. La présentation des verres bioactifs, objets de notre étude, ainsi que le choix des éléments dopants introduits, sont également développés de façon approfondie dans cette partie.

La seconde partie présente la synthèse des verres, ainsi que les méthodes expérimentales utilisées pour les différentes caractérisations physico-chimiques réalisés. Les protocoles expérimentaux pour les synthèses et l'évaluation du comportement *in vitro* des matériaux y sont exposés. Les détails techniques concernant la préparation des échantillons et l'utilisation des différentes techniques de caractérisation sont également développés dans cette partie.

La troisième partie regroupe l'ensemble des résultats obtenus à l'issue des tests *in vitro* pour les différentes compositions de verres étudiées. Le processus de bioactivité y est exposé de façon détaillée, en se basant sur l'étude du verre pur de référence. L'influence des éléments dopants introduits dans la matrice vitreuse est mise en évidence en comparant et en interprétant les différences observées sur la réactivité chimique et la bioactivité des verres.

La quatrième partie présente les études réalisées sur poudre, notamment par RMN du Solide. L'objectif de cette partie est d'une part de savoir si les éléments introduits dans la composition chimique ont une influence sur la structure même du verre et d'autre part, d'effectuer une approche originale de l'étude de la réactivité chimique des verres et du processus de bioactivité.

La cinquième partie regroupe les résultats biologiques des études *in vitro* en milieu cellulaire, réalisés dans le cadre de collaborations nationales et internationales. Le but de cette étude est d'évaluer la cytotoxicité, ainsi que la prolifération cellulaire au contact des différents matériaux étudiés.

La sixième partie développe la mise au point et l'élaboration de matériaux poreux à base de verres bioactifs par une voie de synthèse originale. Deux types de matériaux ont été synthétisés et des tests *in vitro* ont été réalisés pour le premier d'entre eux. Des travaux de recherche sont encore en cours sur cette étude.

Enfin, une conclusion générale et les perspectives de ce travail de thèse sont exposées à la fin de ce manuscrit.

# PARTIE 1

## **Etude Bibliographique**





# Chapitre 1

## Les Biomatériaux

### 1. Les biomatériaux de comblement osseux

#### 1.1. Définition générale des biomatériaux

Le vieillissement régulier de la population, le refus de l'homme d'accepter la douleur ou le handicap entraînent la croissance exponentielle des besoins en biomatériaux dans tous les domaines de la santé. En France, 3,2 millions de personnes sont porteuses d'un biomatériau (toutes sortes confondues) ; la préservation de l'intégrité corporelle et de l'autonomie des personnes est un enjeu majeur de notre société. Plusieurs axes de recherche se mettent au point pour concevoir et développer de nouveaux matériaux destinés à remplir des tâches, que le corps n'est plus capable d'assurer. Ces matériaux trouvent ainsi des applications aussi bien en chirurgie cardiaque (valves cardiaques, stents), en ophtalmologie (lentilles de contact) qu'en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale ou dentaire (prothèses, comblement osseux, substitution).

Ainsi, les biomatériaux ne se définissent pas par leur nature mais par l'usage auquel on les destine. Il est donc difficile de leur donner une définition totalement satisfaisante de part leur grande variété d'application. Néanmoins, la Conférence du Consensus, réunie à Chester à l'initiative de la Société Européenne des Biomatériaux en mars 1986, a proposée de définir un biomatériau comme « un matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques » [1].

Les biomatériaux de comblement osseux, utilisés en chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale, permettent de remédier aux pertes osseuses trop importantes, consécutives à un accident, un traumatisme ou une pathologie quelconque.

Les substituts osseux doivent donc être tolérés par l'organisme et capables de créer des liaisons intimes fortes avec le tissu osseux environnant. Dans les zones sous charges du squelette, ils doivent posséder également des caractéristiques biomécaniques optimales, afin

de permettre à celui-ci de continuer à jouer son rôle de charpente. Enfin, en cas de pertes osseuses importantes, les biomatériaux de comblement doivent favoriser la croissance osseuse. Les recherches actuelles s'orientent donc vers la conception de substituts osseux tolérés par l'organisme, présentant des propriétés biomécaniques comparables à celles de l'os et susceptibles d'être résorbés progressivement, afin de permettre la recolonisation du site d'implantation par de l'os néoformé.

## 1.2. Les biomatériaux d'origine naturelle : les greffes osseuses

L'os est le meilleur substitut de comblement osseux. Il est le seul à présenter l'ensemble des propriétés requises pour une parfaite intégration du substitut osseux. Il existe différents types de greffes osseuses, qui peuvent être classées selon l'origine du greffon [2].

### **Les autogreffes**

L'autogreffe est une greffe où donneur et receveur sont la même personne. Le taux de réussite de ce type de greffe est maximal, étant donné que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur et du receveur est le même. Aucune réaction immunitaire n'est déclenchée. Cependant, l'autogreffe implique la réalisation d'un second site opératoire et certains patients disposent d'un capital osseux insuffisant pour ce type de greffe.

### **Les allogreffes**

Les allogreffes sont les greffes les plus courantes. Elles concernent les cas où donneur et receveur font partie de la même espèce biologique mais, étant deux individus distincts, donneur et receveur possèdent des CMH différents. Dans ces cas, la greffe s'accompagne d'un traitement immunosuppresseur visant à prévenir le rejet de la greffe. Plus les CMH sont ressemblants, plus la greffe a des chances de réussite. Ces greffes sont régies par les lois bioéthiques de 1994 et impliquent le respect du corps humain (consentement et anonymat du donneur).

### **Les xénogreffes**

La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. Le greffon subit préalablement une série de traitements afin d'éliminer toute trace d'agent infectieux.

Cependant, afin d'offrir une alternative à l'utilisation des greffes osseuses, de nouveaux biomatériaux de comblement osseux (synthétiques ou d'origine naturelle) sont mis au point et développés. Même si l'os reste le meilleur substitut osseux à de nombreux points de vue, ils permettent de limiter les risques inhérents aux greffes osseuses, tels que la transmission d'agents infectieux (virus, prions) et sont disponibles en quantité non limitée [3,4].

### 1.3. Quelques biomatériaux synthétiques de comblement osseux

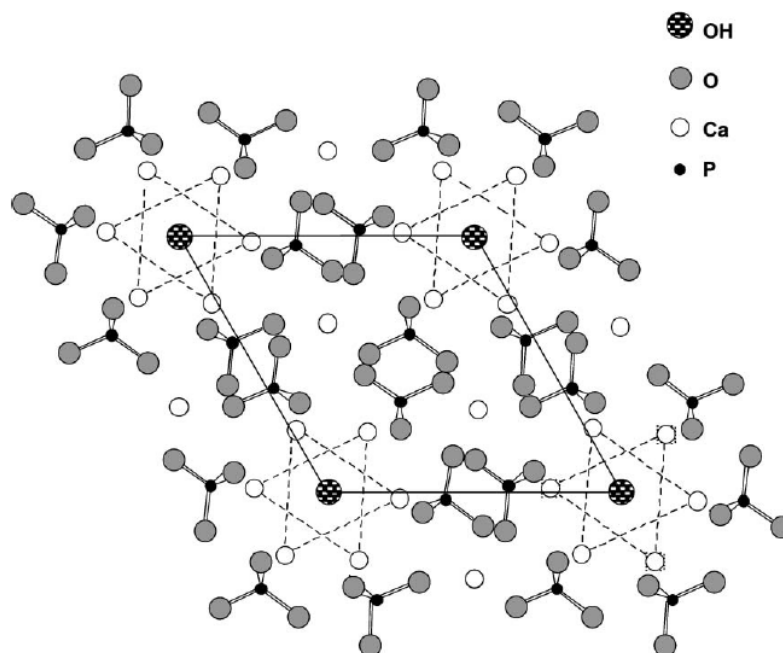
#### 1.3.1. Les céramiques phosphocalciques

La famille des céramiques phosphocalciques regroupe de nombreux substituts osseux. On y trouve notamment l'hydroxyapatite (HA, de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et de rapport Ca/P = 1,67), le phosphate tri-calcique (TCP, de formule  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , sous la forme  $\alpha$  ou  $\beta$  et de rapport Ca/P = 1,5) ou les céramiques biphasées (BCP, association de HA et  $\beta$ -TCP) [5,6].

Qu'elles soient d'origine biologique ou synthétique, les céramiques phosphocalciques peuvent être denses ou poreuses selon leur application. Ces dernières présentent alors deux types de porosité : une microporosité (inférieure à 10  $\mu\text{m}$ ), lieu des échanges chimiques et une macroporosité (supérieure à 100  $\mu\text{m}$ ), lieu des processus biologiques. De plus, les céramiques de phosphate de calcium sont ostéoconductrices, c'est-à-dire qu'elles servent de support à la repousse osseuse grâce à leur macroporosité. Elles peuvent être également biorésorbables, c'est-à-dire dégradées au travers de processus chimiques et cellulaires, favorisés par la microporosité. Enfin, ces biomatériaux n'induisent pas de réactions d'inflammations et ne présentent aucune toxicité [4].

Parmi les céramiques de phosphate de calcium, l'hydroxyapatite est celle qui se rapproche le plus de la phase minérale de l'os à la fois par sa structure cristallographique et par sa composition chimique. L'hydroxyapatite stoechiométrique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  cristallise dans le système hexagonal selon le groupe d'espace  $\text{P6}_3/\text{m}$ . Les paramètres de maille de ses cristaux sont  $a = b = 9,432 \text{ \AA}$  et  $c = 6,881 \text{ \AA}$  [7,8].

Il existe deux types de tunnels perpendiculaires au plan (001). Les premiers sont centrés sur les axes ternaires de la structure et sont occupés par 4 ions  $\text{Ca}^{2+}$  (désignés par Ca1). Leur diamètre est d'environ 2 Å. Le second type de tunnel est centré sur les axes à symétrie hexagonale parallèles à l'axe c. Leur diamètre est compris entre 3 et 3,5 Å. Ils sont occupés par 2 ions  $\text{OH}^-$  (au centre) et par 6 ions  $\text{Ca}^{2+}$  (notés Ca2) [8]. La projection de la structure sur le plan (001) met en évidence la symétrie hexagonale de ces tunnels (figure 1.1).



**Figure 1.1.** Projection de la structure de l'HA dans le plan (001) [8]

Les tunnels revêtent une importance particulière dans le comportement physico-chimique de l'hydroxyapatite par leur aptitude à favoriser les échanges ioniques. En effet, les ions  $\text{OH}^-$  jouissent d'une grande mobilité et peuvent donc être facilement substitués, soit par des ions monovalents ( $\text{Cl}^-$  ou  $\text{F}^-$ ), soit par des ions bivalents ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Des substitutions sont également possibles sur les sites  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ...) ainsi que sur les sites  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  ...) [9].

L'hydroxyapatite peut être d'origine synthétique, mais également biologique. Elle est alors obtenue par traitement thermique à haute température (pyrolyse puis céramisation à 1200-1300°C) de structures biologiques phosphocalciques pré-existantes, comme le corail ou l'os. Ce traitement thermique détruit les éléments organiques et céramise la trame phosphocalcique [10].

### 1.3.2. Le carbonate de calcium naturel (corail) ou synthétique

Les premières études portant sur les applications du corail en chirurgie osseuse datent des années 1970. Ce substitut est utilisé sous forme de granules, qui proviennent du squelette minéral du corail madréporaire du genre *Porites* [11]. Ce dernier est caractérisé par une porosité multidirectionnelle, interconnectée, proche de 50% et avec des tailles de pores comprises entre 150 et 250  $\mu\text{m}$ . Ses caractéristiques mécaniques sont proches de celles de l'os spongieux. Il se compose majoritairement de cristaux de carbonate de calcium en phase aragonite [12].

Lors d'études *in vivo*, la biodégradation du corail a été démontrée par une vascularisation rapide de l'implant, suivie d'une phase de résorption de ce dernier au profit du tissu osseux [11,12]. Cependant sa cinétique de résorption dépend du site d'implantation et du type de corail utilisé [13-15].

Le carbonate de calcium synthétique et le corail naturel présentent la même structure cristallographique (aragonite). L'équipe Chimie du Solide et Matériaux, de l'UMR-CNRS 6226 Sciences Chimiques de Rennes, maîtrise la synthèse de ce substitut osseux [16]. Le carbonate de calcium synthétique est obtenu par double précipitation de sels de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) et d'hydrogénocarbonate de potassium ( $\text{KHCO}_3$ ). Après filtration et séchage, le matériau obtenu présente une granulométrie d'environ 20  $\mu\text{m}$ . Le matériau de comblement final est obtenu par compactage isostatique et présente des pourcentages de porosité variables en fonction du pourcentage de porogène introduit avant compactage [17]. Ce carbonate de calcium synthétique a été également étudié comme vecteur d'antibiotique (sulfate de gentamicine, utilisé en orthopédie pour le traitement d'éventuels foyers infectieux). L'antibiotique est alors directement intégré pendant la synthèse du carbonate de calcium et la cinétique de relargage de la gentamicine est fonction du pourcentage de porosité du matériau [18,19].

### 1.3.3. Les composites géopolymères – phosphate de calcium

Afin d'optimiser le compromis entre pourcentage de porosité et propriétés mécaniques (voisines de celles de l'os spongieux), des composites géopolymères – phosphate de calcium ont été également étudiés au sein de l'équipe Chimie de Solide et Matériaux de l'UMR-CNRS 6226 [2].

Les géopolymères font partie de la famille des aluminosilicates et peuvent être assimilés à des polymères minéraux, de formule générale  $M^+_n \{(SiO_2)_z, AlO_2\}_n, w H_2O$  où  $z$  le rapport molaire Si/Al,  $M^+$  un cation monovalent et  $n$  le degré de polymérisation. Ces composés présentent une bonne stabilité à la température, aux attaques acides et de bonnes propriétés mécaniques. Ils sont synthétisés à partir de silicate alcalin et d'oxydes pulvérents d'aluminium et de silicium à une température inférieure à 100°C [20].

Les composites synthétisés au sein du laboratoire sont constitués d'une matrice géopolymère, associée à des phosphates de calcium : hydroxyapatite, phosphate tri-calcique et biphasique. Après traitement thermique à 500°C, les composites présentent des valeurs de pH voisines de 7 ainsi qu'un bon compromis porosité/contrainte à la rupture (en compression) [21-23]. Des études *in vitro* et *in vivo* réalisées ont démontré l'ostéointégration des composites après 3 mois d'implantation [2].

## **2. Propriétés et classifications des biomatériaux**

### **2.1. Biocompatibilité d'un comblement osseux**

La biocompatibilité est la propriété essentielle que doit posséder tout matériau utilisé comme biomatériau de comblement osseux. La notion de biocompatibilité a longtemps été réduite à l'absence de processus de dégradation et de rejet du biomatériau implanté. Aujourd'hui, elle doit permettre d'apprécier la sûreté et l'efficacité à long terme d'un biomatériau. Une première proposition en 1987 définit la biocompatibilité comme "la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique" [24]. Une définition plus complète est ensuite proposée en 1998 et définit la biocompatibilité comme "l'ensemble des interrelations entre le matériau et le milieu environnant, et leurs conséquences biologiques locales ou générales, immédiates ou différées, réversibles ou définitives" [25].

Ainsi, l'étude de la biocompatibilité d'un matériau consiste en la compréhension globale des mécanismes interactifs entre le matériau et le milieu biologique environnant. Biocompatible signifie d'une part que le matériau n'est pas à l'origine de phénomènes locaux ou systémiques néfastes pour la santé du receveur et d'autre part que les tissus receveurs et les liquides interstitiels ne sont pas susceptibles d'altérer le matériau (sauf lorsque cela est souhaité) au détriment de ses propriétés mécaniques, de ses qualités intrinsèques générales ou au risque de générer des produits de dégradation ou de corrosion toxiques.

## 2.2. Classification des biomatériaux en fonction de l'interface formée avec les tissus

L'intégration d'un matériau de comblement osseux peut être corrélée aux différents phénomènes qui se produisent à l'interface tissu osseux/implant. En effet, aucun matériau implanté dans un organisme vivant n'est totalement inerte: une réponse des tissus vivants est toujours observée [26]. Ainsi, en fonction des différentes réponses observées, Larry Hench a proposé une classification des substituts osseux en quatre catégories [3]

### **Biomatériaux inertes**

La réponse tissulaire à un implant inerte ou biologiquement inactif, est la formation d'une capsule fibreuse non-adhérente. Aucune réaction inflammatoire n'est observée, mais aucune liaison ne se développe entre les tissus osseux et l'implant. L'épaisseur de cette couche fibreuse protectrice dépend du type de biomatériau inerte, du lieu d'implantation ou encore des contraintes mécaniques. La fixation observée est morphologique car la matrice osseuse s'accroche aux irrégularités de surface du matériau. Cependant, à long terme, l'interface tissu osseux/implant finit par se détériorer dans la plupart des cas et une intervention chirurgicale est nécessaire pour retirer l'implant (problème rencontré pour les prothèses de hanches par exemple).

### **Biomatériaux poreux**

Les biomatériaux poreux interagissent avec les tissus osseux, par l'intermédiaire d'une fixation biologique. Des liaisons sont créées à l'interface tissu osseux/implant par colonisation des cellules osseuses et donc croissance de tissu osseux à l'intérieur des pores. Cependant, une fixation biologique correcte nécessite un diamètre de pores supérieur à 100  $\mu\text{m}$ . Les biomatériaux poreux présentent de ce fait des propriétés mécaniques plus faibles que les matériaux massifs, ce qui empêche leur utilisation dans les zones sous charge (soumises à de fortes contraintes mécaniques).

### **Biomatériaux résorbables**

Les biomatériaux résorbables sont une solution alternative aux problèmes rencontrés lors des implantations à long terme en permettant la régénération des tissus osseux. En effet, ce type de biomatériau, une fois implanté, se dégrade suite aux activités enzymatiques, cellulaires ou



encore bactériennes. Sa disparition s'effectue au profit d'un remplacement à terme par les tissus osseux. Les produits de dégradation du matériau, évacués par voie rénale ou métabolisés, ne doivent présenter aucune toxicité. Néanmoins, il est nécessaire que la cinétique de résorption de ces matériaux soit proche de la cinétique d'ossification. Cette dernière condition est particulièrement difficile à remplir et nécessite une étude approfondie, préalable à leur implantation.

### **Biomatériaux bioactifs**

Les matériaux bioactifs permettent quant à eux l'obtention d'une interface tissu osseux/implant stable, appelée fixation bioactive. Quand un matériau bioactif est implanté dans le corps, une série de réactions biophysiques et biochimiques s'opère à l'interface tissu osseux/implant. Ces réactions aboutissent à la formation de liaisons chimiques fortes entre l'implant et le tissu osseux [27]. Les verres bioactifs, qui font l'objet de ce travail de thèse, appartiennent à cette dernière catégorie de biomatériaux.

Type de biomatériau	Exemples
Inerte	Métaux et alliages, notamment à base de titane Alumine, zircone (PSZ), polyéthylène
Poreux	Hydroxyapatite, carbonate de calcium
Résorbable	Phosphate tri-calcique, acide polylactique Sulfate de calcium (plâtre de Paris)
Bioactif	Verres bioactifs, hydroxyapatite

**Tableau 1.1.** Exemples de biomatériaux en fonction de l'interface tissu osseux/implant [2]

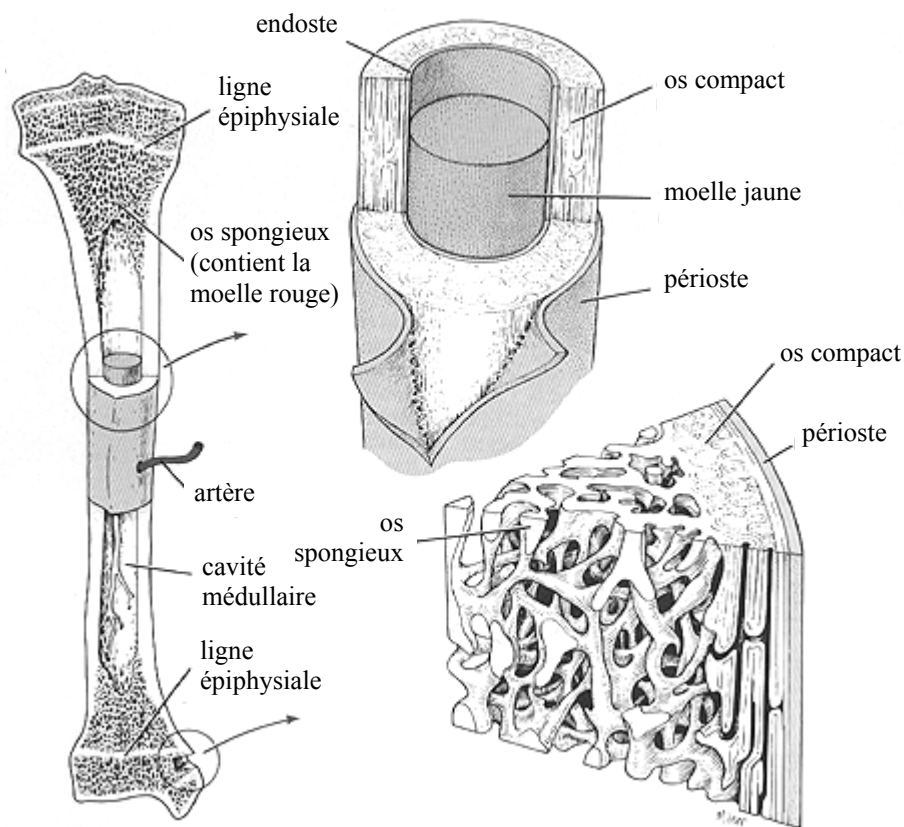
## **2.3. Optimisation des biomatériaux pour une application en tant que matériaux de comblement osseux**

Le produit de comblement osseux idéal est un biomatériau ayant des propriétés proches de celles l'os, pouvant être à la fois sûr, efficace et disponible. Il est donc indispensable de connaître la structure et les propriétés physico-chimiques, mécaniques et morphologiques du tissu osseux, afin de disposer du substitut le mieux adapté.

### 2.3.1. Description du tissu osseux

Les os remplissent différentes fonctions dans le corps humain. Ils donnent au corps sa structure, soutiennent et protègent les parties molles, et renferment la moelle, qui produit les cellules sanguines. Les os contiennent en outre les réservoirs de calcium et de phosphore que l'organisme peut mobiliser par résorption, selon ses besoins. De plus, les os détoxifient le corps en éliminant les métaux lourds, tels que le plomb et l'arsenic, ainsi que d'autres toxines, véhiculés dans la circulation générale [28].

Ce sont des structures en perpétuel renouvellement ; on distingue deux types : l'os spongieux et l'os cortical (figure 1.2) [28,29]. L'os spongieux ou trabéculaire est formé de tiges ou travées de soutien et occupe l'intérieur des vertèbres, du bassin, des os plats et des extrémités des os longs. Il constitue 20 % du squelette, mais il présente une grande surface de contact et est sensible aux variations métaboliques. L'os cortical ou compact compose les 80 % restants du squelette et est situé principalement dans les os longs.



**Figure 1.2.** Structure de l'os [30]

Le tissu osseux est une matrice extracellulaire constituée d'eau, d'une trame organo-minérale et de cellules osseuses. La partie organique de la trame organo-minérale est constituée à 95% de collagène de type I, alors que la phase minérale est principalement formée de cristaux d'hydroxyapatite carbonatée mal cristallisée. On trouve également dans cette dernière des éléments mineurs, tels que le magnésium, le sodium, le potassium ou le chlore, ainsi que de nombreux éléments présents à l'état de trace (fer, fluor, zinc,...). Parmi les cellules osseuses présentes, les ostéoblastes permettent la synthèse de la matrice extracellulaire et les ostéoclastes sont responsables de sa résorption [28]. Ainsi, les ostéoblastes et les ostéoclastes agissent en synergie afin d'assurer le remodelage osseux.

### 2.3.2. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des biomatériaux doivent être proches de celles de l'os pour permettre le transfert des contraintes entre l'os et le substitut osseux (tableau 1.2). En particulier, l'élasticité du matériau, traduite par le module d'Young, doit être adaptée. En effet, le module d'Young de l'os cortical est compris entre 7 et 25 GPa [3]. Si le module d'Young du matériau implanté est trop différent, il y aura un mauvais transfert de contraintes entre l'os et la prothèse, avec comme conséquence à terme une résorption de l'os et un "déchaussement" de l'implant.

Matériaux	Module d'Young E (GPa)	Dureté Vickers $H_V$ (GPa)	Ténacité $K_{IC}$ (MPa.m <sup>-1/2</sup> )	Résistance en compression $\sigma_c$ (MPa)	Résistance en flexion $\sigma_f$ (MPa)
Os cortical	7-25		2-12		50-150
Os spongieux	0,05-0,5			2-12	
HA	80-110	6	0,6-1		115-200
Bioglass® 45S5	35	4,6	2		42
Cerabone® A-W	118	6,8	2		215
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	380-410	23	5-6		595
PSZ	195-210	13	15		1000

PSZ : zirconne partiellement stabilisée

**Tableau 1.2.** Propriétés mécaniques de l'os et de quelques biomatériaux [3]

L'amélioration de la résistance mécanique, aussi bien en traction, en compression qu'en ténacité<sup>1</sup> ou dureté, est également l'objet de nombreux travaux afin de développer des matériaux possédant à la fois un faible module d'élasticité et une résistance élevée.

### 3. Intérêt physiologique de certains éléments chimiques

De nombreux éléments chimiques sont présents dans le corps humain. En effet, 98% de la masse d'un organisme est constitué de 6 éléments majeurs : oxygène, carbone, azote, hydrogène, calcium et phosphore. Parmi les éléments également présents, on distingue les éléments mineurs, dont la teneur est comprise entre 1 et 0,01% de la masse, et les éléments à l'état de trace, dont la teneur est inférieure à 0,01%.

Eléments mineurs	Eléments à l'état de trace		
Magnésium	Zinc	Rubidium	Chrome
Potassium	Strontium	Vanadium	Cobalt
Sodium	Fer	Sélénium	Uranium
Soufre	Fluor	Manganèse	Béryllium
Chlore	Cuivre	Iode	Silicium
	Brome	Nickel	Etain

**Tableau 1.3.** Eléments mineurs et traces dans l'organisme [31]

Selon la définition de l'OMS de 1996, un élément est considéré comme essentiel à l'organisme lorsque la diminution de sa teneur en dessous d'une certaine limite altère une fonction physiologiquement importante, ou lorsque l'élément fait partie d'une structure organique ayant une fonction vitale pour l'organisme. C'est ainsi qu'un certain nombre d'éléments tels que le zinc, le cuivre, le sélénium, le manganèse, etc., sont considérés comme des éléments essentiels, sur le plan vital, à notre organisme [32-33].

<sup>1</sup> Capacité d'un matériau à résister à la propagation d'une fissure existante

Une partie de ce travail de thèse s'est basée sur l'hypothèse que l'introduction dans un biomatériau d'éléments ayant un rôle physiologique important pourrait permettre d'améliorer son intégration dans l'organisme et favoriser la repousse osseuse. Notre choix s'est porté sur trois éléments en particulier : le magnésium, le zinc et le strontium, dont les propriétés physiologiques sont présentées ci-dessous.

### **Le magnésium**

Le magnésium est un élément essentiel au métabolisme du corps humain. Il est naturellement présent dans la matrice osseuse, dont il est un des éléments minéraux mineurs, majoritairement présent [34-36]. Environ la moitié du magnésium présent dans l'organisme est stockée dans la matrice osseuse (environ 5 mg/g), et en particulier dans les cristaux d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{3-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_2$  [34].

Le magnésium joue un rôle important lors de la phase de croissance de l'organisme (de la naissance à l'âge adulte) et il est fourni par l'alimentation. La teneur en magnésium dans l'os dépend de nombreux facteurs et l'équilibre des concentrations entre les différents tissus est assuré par les reins et le système intestinal [35-36].

De nombreuses enzymes sont dépendantes du magnésium (constitution et activation). Ce dernier permet la stabilisation de la structure de l'ADN et de l'ARN [36]. De plus, grâce à ses rôles fonctionnels et sa présence dans le tissu osseux, le magnésium permet de stimuler la croissance des tissus osseux [37-39].

### **Le zinc**

Le zinc est l'un des éléments traces les plus importants de l'organisme. Il est présent aussi bien au niveau des organes, que des muscles ou encore du squelette [32-33]. La teneur en zinc dans les tissus osseux est de 117 µg/g [34]. Cet élément est connu pour son rôle dans de nombreuses fonctions biologiques, comme les réactions enzymatiques (il participe à plus de 300), la synthèse de protéines ou encore l'activité hormonale [40-41].

Concernant les biomatériaux de comblement osseux, l'introduction de zinc améliore la prolifération des ostéoblastes ainsi que la repousse osseuse sur le site d'implantation, en permettant une meilleure cicatrisation [42-46]. L'introduction de zinc permet d'améliorer les propriétés thermiques et mécaniques de verres de silice. Dans les verres de phosphate, sa présence permet d'augmenter la stabilité chimique des verres en milieu aqueux [47-48]. Enfin, des études préliminaires ont montré que la présence de zinc pourrait avoir une influence sur la morphologie et la cristallisation de cristaux d'apatite biologiques [49].

**Le strontium**

Le strontium présente des propriétés chimiques très proches de celles du calcium. Comme ce dernier, il joue un rôle important au niveau de la matrice osseuse et 98% du strontium total de l'organisme est stocké dans les tissus osseux (140  $\mu\text{g/g}$ ) [32-34].

Le strontium est également connu pour son rôle dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose, grâce à sa capacité à stimuler la repousse osseuse et à prévenir la résorption de l'os [50-52]. Il est alors utilisé sous la forme de sel divalent, le ranelate de strontium, et introduit à faible dose (légèrement supérieure à sa concentration physiologique) [51-52]. En effet, des concentrations trop élevées en strontium (8,75 mmol/kg/jour chez le rat) dans l'organisme peuvent conduire à des défauts de minéralisation osseuse [53].

De plus, l'introduction de strontium améliore l'activité des ostéoblastes et son incorporation dans la phase minérale de l'os (le strontium se substitue au calcium dans les cristaux d'apatite) induit des modifications sur les paramètres de maille, la taille des cristaux et la cristallinité de l'hydroxyapatite. Les apatites enrichies en strontium sont alors plus stables, ce qui défavorise la résorption de l'os [54].



## Chapitre 2

### Les verres bioactifs

Les verres bioactifs ont été découverts par Larry Hench en 1969 [55]. Son but était de mettre au point de nouveaux matériaux qui seraient parfaitement intégrés dans le corps humain. Le Bioglass<sup>®</sup> 45S5, de composition massique : 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% CaO, 24,5% Na<sub>2</sub>O et 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, a été le premier verre bioactif développé. Cette composition est très proche de l'eutectique du diagramme ternaire SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O et les premiers essais *in vivo* ont été réalisés dans des fémurs de rats [56]. Après 6 semaines d'implantation, le Bioglass<sup>®</sup> était parfaitement intégrés aux tissus osseux et il était impossible de retirer les implants.

Des études *in vitro* ont par la suite permis de comprendre la nature des liaisons à l'interface implant/tissu osseux (décrites au paragraphe III.4) [2]. Ainsi, le Bioglass<sup>®</sup>, par sa capacité à se lier spontanément aux tissus osseux, sa sûreté et sa grande disponibilité, a été de plus en plus utilisé dans des opérations cliniques au cours des vingt dernières années [57]. De nombreux autres verres bioactifs ou vitrocéramiques ont été également développés depuis, notamment le NovaBone<sup>®</sup>, le Ceravital<sup>®</sup> ou encore le Cerabone<sup>®</sup> A/W, qui sont tous les trois des produits commercialisés [58].

## 1. Généralités sur le verre

### 1.1. Définition

Objet décoratif, le verre est devenu un objet d'usage commun d'abord utilisé en tant que récipient étanche, puis en tant que matériau transparent. Ses propriétés ont été améliorées au cours des siècles et le verre connaît aujourd'hui une grande variété d'applications.

Le verre est un matériau utilisé essentiellement en optique pour ses propriétés réfringentes (lentilles, verres de lunettes). Il est également utilisé en chimie et dans l'industrie agroalimentaire car il réagit très peu avec la plupart des composés utilisés dans ces domaines ;



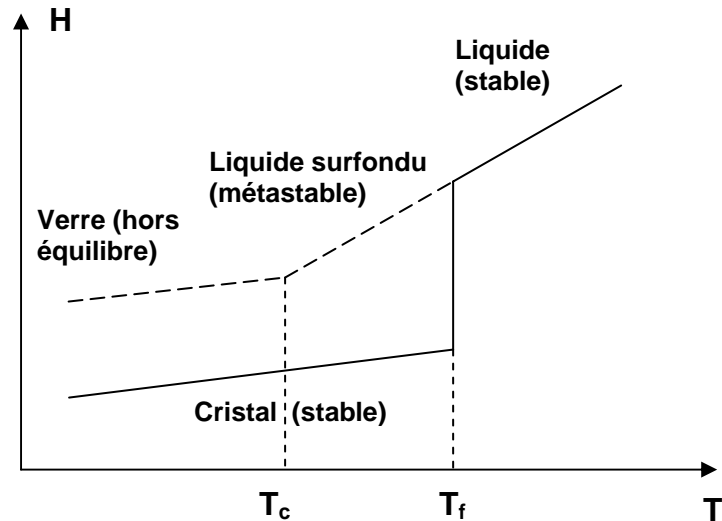
c'est donc un matériau idéal pour les contenants (bouteilles, pots de yaourt, béchers, erlenmeyers, colonne de distillation, éprouvettes, tubes à essai...). Le verre est le matériau dans lequel sont confinés les déchets nucléaires de haute activité par le procédé de vitrification. En effet sa structure désordonnée permet d'absorber une partie des radiations. C'est aussi un matériau de construction très important dans l'architecture moderne et dans l'industrie automobile. Il est notamment présent sous forme de laine de verre, isolant léger, imputrescible et ininflammable. Actuellement, l'émergence de nouvelles familles de verre comme les chalcogénures ou les fluorures étend encore les potentialités de ce matériau hors du commun.

## 1.2. Propriétés du verre

Le verre est un solide amorphe présentant le phénomène de transition vitreuse [59]. L'état physique correspondant est appelé état vitreux. De ce fait, le verre présente un désordre structural important. Sa structure microscopique est telle qu'il n'existe aucun ordre à grande distance dans un verre. Il peut même être vu comme un "réseau" tridimensionnel, semblable à celui d'un cristal, mais dans lequel seul l'ordre à courte distance est conservé.

### **Phénomène de transition vitreuse**

D'un point de vue thermodynamique, le verre est obtenu à partir d'une phase liquide surfondue solidifiée à la température de transition vitreuse,  $T_g$ . A priori, pour des températures inférieures à la température de fusion  $T_f$ , l'état le plus stable thermodynamiquement correspond à l'état cristallisé. À  $T_f$ , on observe alors une variation ainsi qu'un changement de pente de l'enthalpie  $H$  (cette pente est beaucoup plus faible pour un solide que pour un liquide). Mais si, lors du refroidissement du liquide, la viscosité est trop importante ou le refroidissement très rapide, la cristallisation n'a pas le temps de se produire et un liquide surfondu est alors obtenu. Aucune discontinuité de l'enthalpie  $H$  n'est alors observée à  $T_f$  et sa pente reste inchangée (figure 2.1). En poursuivant le refroidissement, la viscosité du liquide augmente rapidement et le liquide surfondu devient quasiment solide. Lorsque la viscosité atteint  $10^{13}$  poises, la rigidité empêche les mouvements microscopiques locaux et on observe un changement de pente de l'enthalpie (la pente devient la même que pour celle du composé cristallisé) [59].

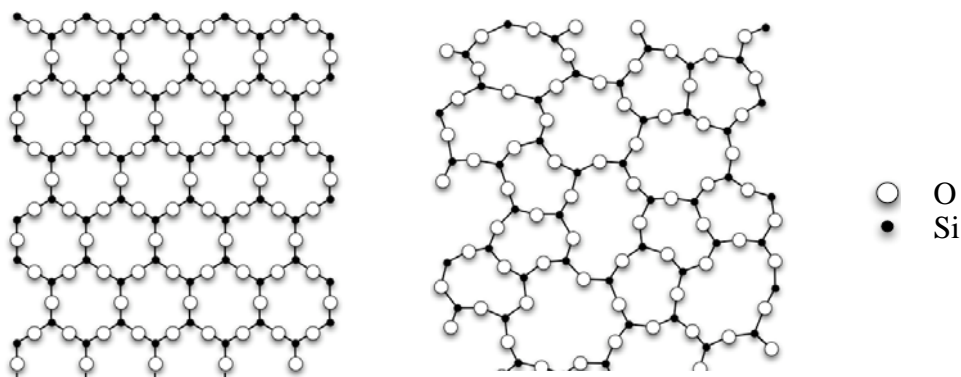


**Figure 2.1.** Variations de l'enthalpie H lors du passage de l'état liquide à l'état solide

La température à laquelle se produit ce changement s'appelle température de transition vitreuse,  $T_g$ . Ainsi, pour une température inférieure à  $T_g$ , le matériau est un solide avec le désordre structural d'un liquide : c'est un verre.

### Structure du verre

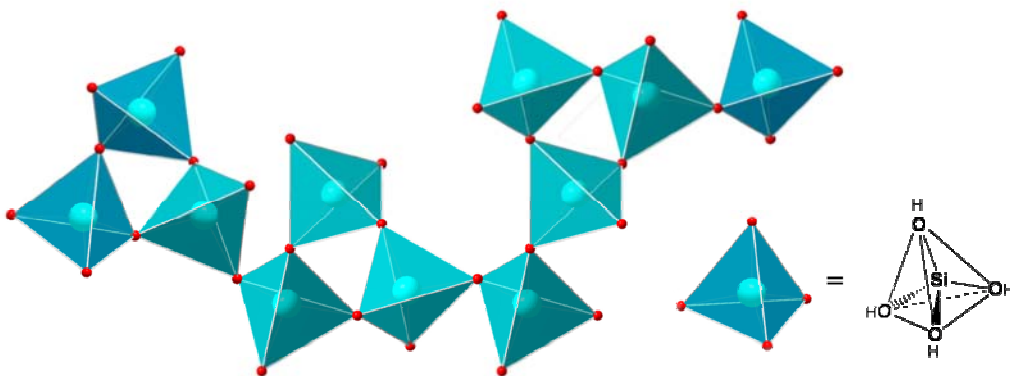
La figure 2.2 représente la structure de la silice ( $\text{SiO}_2$ ) cristalline (sous sa forme cristobalite) et celle de la silice vitreuse. Dans ces deux cas, chaque atome de silicium est lié avec quatre atomes d'oxygène et forme ainsi des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ . Dans la silice cristalline, le réseau du verre est constitué d'un arrangement régulier des tétraèdres  $\text{SiO}_4$  joints par les sommets. Le réseau de la silice vitreuse est formé par les mêmes tétraèdres  $\text{SiO}_4$  joints par les sommets, mais cette fois organisés de manière anarchique [59].



**Figure 2.2.** Représentation 2D des réseaux de silice cristalline et vitreuse [60]

De plus, en raison de sa structure amorphe, le verre est soumis à très peu de contraintes stoechiométriques. Ainsi, un verre peut inclure dans sa matrice une très grande variété d'éléments et présenter des compositions très complexes. Dans un verre d'oxydes, ces différents éléments sont sous forme cationique, afin de former des oxydes avec l'anion oxygène  $O^{2-}$ . Les cations intervenant dans la composition de verres peuvent être classés en trois catégories selon le rôle structural qu'ils jouent lors de la formation du verre : les formateurs de réseau, les modificateurs de réseau et les intermédiaires. Les critères structuraux de cette classification prennent en compte le nombre de coordination (nombre d'atomes d'oxygène auquel est lié le cation) et les forces de liaison.

Les formateurs de réseau sont des éléments qui peuvent à eux seuls former un verre, comme par exemple le silicium, le bore ou le phosphore. Ce sont des éléments métalliques de valence assez élevée (généralement 3 ou 4, parfois 5), qui forment des liaisons mi-covalente, mi-ionique avec les atomes d'oxygène. Ils donnent des polyèdres de faible coordinence (3 ou 4), comme  $SiO_4$ ,  $BO_4$  ou  $BO_3$ . Ces polyèdres sont liés par leurs sommets et forment le réseau vitreux.



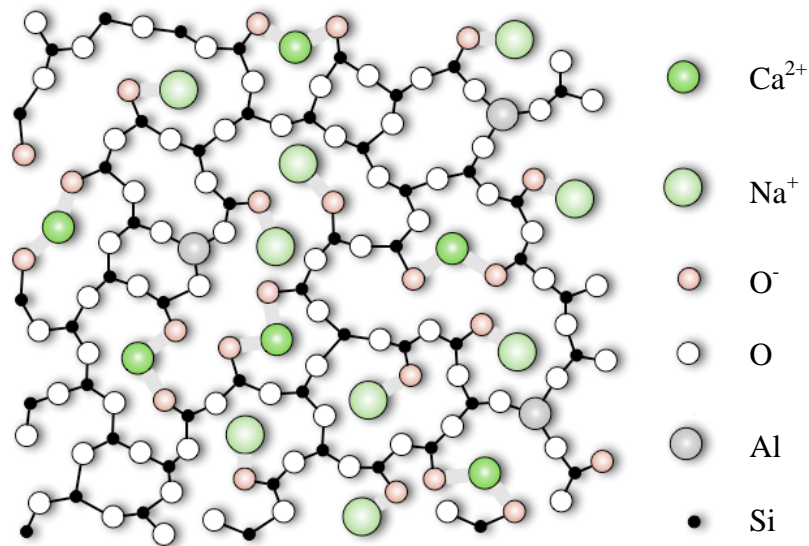
**Figure 2.3.** Représentation schématique du réseau de tétraèdres  $SiO_4$ , formateurs de réseau

Les modificateurs de réseau ne peuvent pas former de verre à eux seuls. Ce sont essentiellement les alcalins, les alcalino-terreux et dans une moindre mesure certains éléments de transition et les terres rares. Ils sont habituellement plus volumineux (rayon ionique plus important) que les formateurs de réseau, faiblement chargés et donnent des polyèdres de grande coordinence. Leurs liaisons avec les atomes d'oxygène sont plus ioniques que celles établies par les formateurs. Ils peuvent avoir deux rôles structuraux bien distincts, soit modificateurs de réseau vrais, soit compensateurs de charge.

Les modificateurs de réseau vrais cassent les liaisons entre les polyèdres du réseau vitreux provoquant une dépolymérisation de ce dernier. Ils transforment alors les oxygènes pontants, qui lient deux éléments formateurs de réseau, en oxygènes non-pontants, liés à un seul formateur de réseau (figure 2.4). Ceci se traduit à l'échelle macroscopique par une diminution du point de fusion et de la viscosité. Les compensateurs de charge quant à eux compensent une charge négative sur un polyèdre formateur de réseau, par exemple  $\text{BO}_4^-$ , lui permettant d'être stable dans cette configuration.

Formateurs	Modificateurs	Intermédiaires
$\text{SiO}_2$	$\text{Li}_2\text{O}$	$\text{Al}_2\text{O}_3$
$\text{GeO}_2$	$\text{Na}_2\text{O}$	$\text{PbO}$
$\text{B}_2\text{O}_3$	$\text{K}_2\text{O}$	$\text{ZnO}$
$\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{CaO}$	$\text{CdO}$
$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{BaO}$	$\text{TiO}_2$
$\text{As}_2\text{O}_5$		
$\text{V}_2\text{O}_5$		

**Tableau 2.1.** Classification des principaux oxydes [59]



**Figure 2.4.** Réseau d'un aluminosilicate en présence des oxydes modificateurs  $\text{CaO}$  et  $\text{Na}_2\text{O}$  [60]

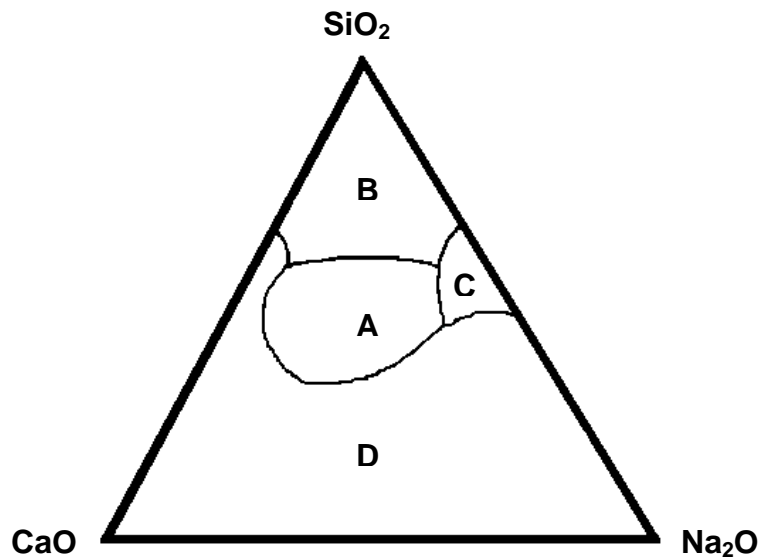
Enfin certains oxydes peuvent fonctionner suivant les compositions dans lesquelles ils entrent soit comme formateurs, soit comme modificateurs, on les appelle alors oxydes intermédiaires (tableau 2.1).

### 1.3. Méthodes de synthèse du verre

#### 1.3.1. Synthèse par fusion

La méthode classique de synthèse des verres est la fusion à haute température. Dans le cas des verres bioactifs, un mélange d'oxydes, avec  $\text{SiO}_2/\text{P}_2\text{O}_5$  comme formateurs de réseau et  $\text{CaO}/\text{Na}_2\text{O}$  comme modificateurs de réseau, est fondu à des températures comprises entre 1000 et 1400°C.

Larry Hench a commencé par étudier le diagramme ternaire  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$  dans lequel il a ajouté systématiquement 6% en masse de  $\text{P}_2\text{O}_5$  [55]. Cependant, la bioactivité n'a été observée que pour certaines compositions, ce qui limite les variations de proportions en  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$  et  $\text{Na}_2\text{O}$ . Il a ainsi été possible de distinguer 4 zones sur le diagramme ternaire  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ , qui présentent des propriétés différentes (figure 2.5) [3].



**Figure 2.5.** Diagramme ternaire du système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$  avec 6 % en masse de  $\text{P}_2\text{O}_5$

La zone A est la zone de bioactivité ; des liaisons chimiques à l'interface verre/os sont créées en moins de 30 jours. Les verres dont les compositions appartiennent à la zone B sont inertes ; leur réactivité est trop faible et aucune liaison ne se forme entre l'os et le verre. La zone C est la zone de résorbabilité ; les verres se dissolvent au contact des fluides biologiques. Enfin, il n'est pas possible de préparer des verres avec compositions appartenant à la zone D.

Ce diagramme ternaire, appelé communément triangle de Hench, met donc en évidence trois caractéristiques que doivent posséder les verres du système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$  pour être bioactifs :

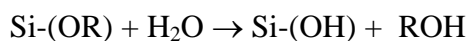
- la proportion en  $\text{SiO}_2$  doit être comprise entre 40 et 60 % en masse
- les proportions en  $\text{CaO}$  et  $\text{Na}_2\text{O}$  doivent être importantes
- le rapport  $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$  doit être supérieur à 4 (en % massique)

### 1.3.2. Synthèse par voie sol-gel

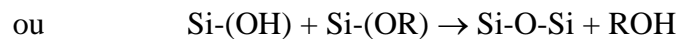
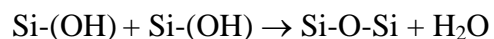
Le procédé sol-gel est une voie de synthèse, développée depuis une trentaine d'années, pour la production de céramiques, de verres et de vitro-céramiques à des températures beaucoup plus basses que les synthèses traditionnelles. Cette technique permet ainsi, par simple polymérisation de précurseurs moléculaires en solution, d'obtenir des matériaux vitreux sans passer par l'étape de fusion. La méthode sol-gel a donc permis de créer une nouvelle génération de verres bioactifs [61].

Les précurseurs moléculaires utilisés dans les procédés sol-gel sont généralement des alcoxydes de silicium  $\text{Si(OR)}_4$  dans lesquels l'atome de silicium tétraédrique est entouré de quatre groupements OR, où R est un groupement alkyle simple (par exemple, méthyle  $\text{CH}_3$  ou éthyle  $\text{C}_2\text{H}_5$ ). La synthèse par voie sol-gel se déroule en deux étapes :

L'hydrolyse, étape d'initiation, qui permet de former les entités réactives Si-OH.



La condensation, étape de propagation, où les groupements Si-OH se transforment en oxygènes pontants. Deux réactions sont possibles pour l'étape de condensation.



Ces réactions de polymérisation conduisent à la formation d'espèces de plus en plus condensées, qui forment un sol (dispersion stable de particules dans un liquide), puis un gel, d'où le nom de procédé sol-gel. Le séchage et la densification de ces gels, par traitements thermiques, permettent d'obtenir un verre aux caractéristiques semblables à celles d'un verre classique.

Ce n'est qu'au début des années 90, que le procédé sol-gel a été appliqué à la synthèse de verres bioactifs comme voie alternative et complémentaire à la méthode classique de fusion [62]. Le premier verre bioactif par voie sol-gel a été obtenu dans le système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  et par la suite, des compositions bioactives très variées ont été synthétisées [63-64]. Dans tous les cas, la synthèse des verres est effectuée par hydrolyse et condensation des précurseurs chimiques, dont les plus courants sont: le TEOS (tétraéthoxysilane,  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ), le TEP (triéthylphosphate,  $\text{O=P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ) ou encore les nitrates ou carbonates de calcium [61].

## 2. Notion de bioactivité

Selon les compositions des verres bioactifs, les mécanismes, la vitesse de formation ou la force des liaisons à l'interface os/implant sont différents. Le taux de formation des liaisons interfaciales peut ainsi être corrélé au niveau de bioactivité du matériau.

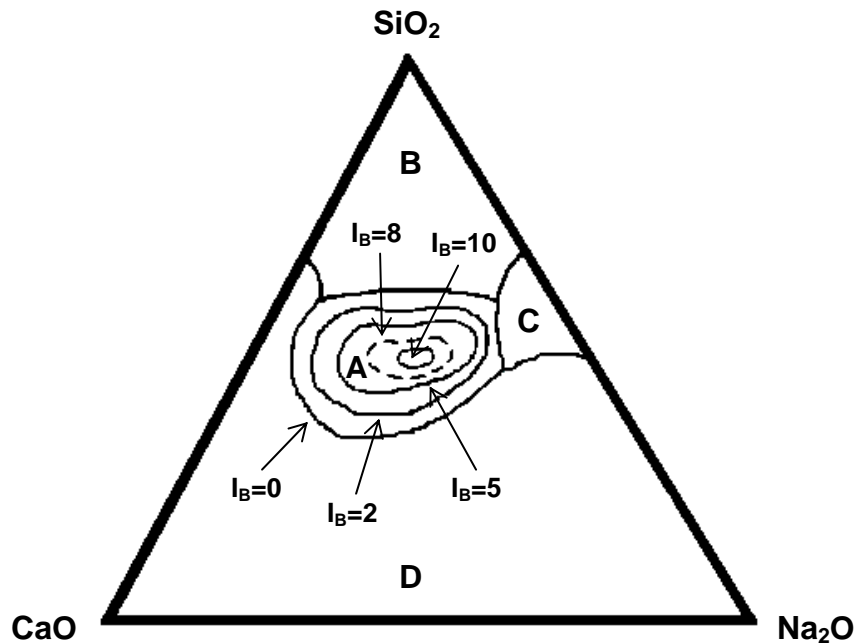
Selon Larry Hench, le niveau de bioactivité d'un matériau est inversement proportionnel au temps au bout duquel plus de 50% de l'interface présente des liaisons entre la surface de l'implant et les tissus osseux ( $t_{0,5bb}$ , en jours, avec bb signifiant bone bonding). Ce dernier a ainsi défini l'indice de bioactivité  $I_B$ , tel que :

$$I_B = \frac{100}{t_{0,5bb}} \quad [3].$$

Dans la zone A de bioactivité du système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ , l'indice de bioactivité  $I_B$  varie de 2 à 12,5 (figure 2.6). Les verres dont la teneur en  $\text{SiO}_2$  est comprise entre 40 et 52% en masse, possèdent un  $I_B$  compris entre 10 et 12,5 et l'indice de bioactivité le plus élevé est obtenu pour le Bioglass<sup>®</sup>. Cependant, l'introduction d'éléments autres que Ca et Na dans la matrice du verre provoque de larges modifications de l'indice bioactivité. A titre d'exemple, Greenspan a montré que l'introduction de 3% d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  supprimait la bioactivité du verre [65].

Le point commun entre tous les verres reconnus comme bioactifs est la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée biologiquement active à la surface des implants lors des tests *in vitro* et *in vivo* [66-68].

Cependant, les différences importantes observées sur la capacité d'un verre bioactif à se lier aux tissus osseux montrent une interdépendance complexe entre les facteurs physico-chimiques, tels que la morphologie, les concentrations ioniques à l'interface verre/fluides biologiques ou encore les cinétiques de relargage.



**Figure 2.6.** Indice de bioactivité  $I_B$  dans le système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O} + 6\% \text{P}_2\text{O}_5$ .

En 1994, une classification en deux catégories des matériaux bioactifs a été proposée par Larry Hench [3]:

- les matériaux bioactifs à la fois ostéonconducteurs et ostéoproducteurs.
- les matériaux bioactifs uniquement ostéonconducteurs.

Un matériau est dit ostéoproducteur quand il est capable de générer la production d'os nouveau. Or la génération d'os nécessite la différenciation des cellules responsables de la formation osseuse. Ainsi les cellules souches ostéoblastiques doivent recevoir un stimulus de la part de leur environnement qui leur intimera l'ordre d'initier le cycle de division cellulaire. Ce stimulus serait une conséquence du relargage rapide des espèces ioniques issues de la dissolution du matériau. En effet, les ions calcium et silicium peuvent promouvoir la



prolifération et la différenciation des ostéoblastes s'ils sont relargués à une vitesse et en quantité appropriées, en agissant sur l'activation de certains gènes et facteurs de croissance [69].

Un matériau ostéoconducteur fournit, quant à lui, une interface biocompatible le long de laquelle les cellules ostéoblastiques peuvent migrer. Ce type de matériau présente une surface moins réactive et donc une cinétique de relargages ioniques fortement diminuée.

Les verres bioactifs sont à la fois ostéoproducteurs et ostéoinducteurs [3].

### 3. Réactions à l'interface verre bioactif/tissus osseux

Ainsi, la bioactivité des verres étudiés est une conséquence d'une série de réactions physico-chimiques qui ont lieu à la surface du matériau lors des tests *in vitro* ou *in vivo*. Contrairement aux verres de silice classiques, qui sont inertes, les verres bioactifs réagissent avec le milieu environnant et en particulier avec les fluides biologiques dans lesquels ils se dissolvent. Ce comportement est du à la composition des verres et notamment à leurs teneurs en alcalins et alcalino-terreux.

Les réactions physico-chimiques s'opérant à la surface des verres bioactifs ont pu être décomposées en cinq étapes [3] et aboutissent à la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée, proche de la phase minérale de l'os. Ces étapes seront développées par la suite dans le Chapitre 11 – *Discussion sur les interactions verres bioactifs – SBF*.

Lors de tests *in vivo*, une fois la couche d'hydroxyapatite formée, les entités biologiques commencent à interagir avec la surface du verre. Six autres étapes résument ces réactions cellulaires [3] :

**Sixième étape** : Adsorption de protéines et de facteurs de croissance à la surface de la couche d'hydroxyapatite carbonatée.

**Septième étape** : Action des macrophages.

**Huitième étape** : Adhésion des ostéoblastes.

**Neuvième étape** : Prolifération et différenciation des ostéoblastes.

**Dixième étape :** Formation d'une matrice minérale par agglomération des cristaux d'apatite, liés entre eux par l'intermédiaire de fibres de collagène.

**Onzième étape :** Cristallisation de cette matrice minérale.

La matrice minérale ainsi obtenue (au bout de 6 à 12 jours) est le produit final des réactions à l'interface verre/tissus osseux.



## PARTIE 2

# **Matériaux et Méthodes Expérimentales**



## Chapitre 3

### Techniques expérimentales

Ce chapitre présente les principales techniques expérimentales utilisées lors de ce travail de thèse. Une brève description du principe de chaque technique de caractérisation est donnée, ainsi que la méthode de préparation des échantillons et les paramètres d'acquisition utilisés au cours des expérimentations.

#### 1. Analyses thermiques

##### 1.1. Principe

L'analyse thermique recouvre l'ensemble des méthodes mesurant les variations des propriétés physiques ou chimiques d'un matériau en fonction de la température ou en fonction du temps à température constante [70].

L'analyse thermique différentielle (ATD) est une méthode analytique au cours de laquelle on mesure la différence de température entre le matériau à étudier et une référence n'évoluant pas dans le domaine de température étudié [71]. Cette méthode permet la mesure des températures de phénomènes caractéristiques et fournit des informations qualitatives sur les chaleurs associées à ces transformations. Dans ce travail, l'analyse thermique permet notamment de déterminer les températures caractéristiques des verres : la température de transition vitreuse  $T_g$ , la température de cristallisation  $T_c$  ou encore la température de fusion  $T_f$ .

L'analyse thermogravimétrique (TG) permet quant à elle l'étude des phénomènes thermiques qui se produisent avec une variation de la masse de l'échantillon [72]. Le principe sur lequel repose cette méthode est donc la mesure en continu de la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température ou en fonction du temps à température constante. La thermogravimétrie est le plus souvent utilisée en couplage avec l'analyse thermique différentielle.

## 1.2. Protocole expérimental

Les analyses thermiques différentielles, couplées à l'analyse thermogravimétrique, ont été réalisées sur l'appareil Setaram Labsys 1600TG-DTA/DSC. Les propriétés thermiques des verres ont été étudiées en nacelle de platine, sous azote et de 25 à 1400°C, selon une loi de chauffe de 5°C/min. Les échantillons sont préalablement broyés et environ 50 mg de poudre sont placés dans le creuset lors des acquisitions. La référence est un creuset en platine vide, similaire à celui contenant l'échantillon. Certaines analyses complémentaires ont également été réalisées sous oxygène, suivant la même loi de chauffe.

## 2. Diffraction des rayons X

### 2.1. Principe

La diffraction des rayons X est une méthode utilisée dans le but d'accéder à des informations qualitatives et quantitatives sur l'arrangement atomique des matériaux étudiés. L'identification des phases ainsi que l'évaluation des paramètres de mailles, voire la détermination de la structure cristalline, sont autant d'informations accessibles par cette méthode [73-75].

L'identification des phases cristallines par diffraction rayons X est rendue possible grâce à la périodicité de l'arrangement atomique au sein des cristaux qui est unique d'une phase à l'autre. Ces périodicités sont dues à un empilement de plans identiques dans un cristal et sont décrites par des longueurs correspondant aux distances entre les plans d'empilement. Cette distance entre les plans réticulaires est nommée distance inter-réticulaire et est notée  $d_{hkl}$ , où les indices de Miller  $hkl$  désignent la direction considérée dans le cristal [73-75].

Si l'on considère un ensemble de plans réticulaires ( $hkl$ ) équidistants de  $d_{hkl}$ , il y a interaction rayonnement - matière et donc diffraction selon la loi de Bragg, c'est-à-dire :

$$2d_{hkl} \sin \theta = n \cdot \lambda$$

Ainsi, pour une certaine valeur de  $d_{hkl}$ , de n l'ordre à la réflexion et sous un rayonnement X incident monochromatique (longueur d'onde  $\lambda$  unique), des intensités diffractées ne peuvent être observées que sous des angles  $2\theta$  bien définis qui représentent un cône de diffraction entre le rayon diffracté et le rayon incident.

L'identification des phases présentes dans un échantillon se fait par comparaison de son diagramme de DRX (positions et intensités des raies diffractées) avec des diagrammes de phases connues [73-75].

## 2.2. Protocole expérimental

Pour les analyses sur échantillons massifs, ces derniers ont été placés directement dans le diffractomètre en s'assurant que leur surface soit bien dans le plan de référence. Les diagrammes ont été obtenus sur le diffractomètre Philips PW3710 en montage de type  $\theta$ - $2\theta$  (Bragg-Brentano) de l'équipe Chimie-Métallurgie (UMR-CNRS 6226). Le rayonnement X est produit par une anticathode de cuivre (conditions habituelles d'utilisation :  $U = 40$  kV et  $I = 30$  mA) dont les raies  $K_{\alpha 1}$  ( $\lambda_{Cu} = 1,54056\text{\AA}$ ) et  $K_{\alpha 2}$  ( $\lambda_{Cu} = 1,54439\text{\AA}$ ) sont isolées grâce à un monochromateur arrière en graphite. Les acquisitions sont réalisées sur un domaine de  $10$  à  $70^\circ$  ( $2\theta$ ), avec un pas de  $0,5^\circ$  ( $2\theta$ ) et un temps de comptage de 10s par pas.

Les matériaux sous forme de poudre ont été analysés sur l'appareil INEL CPS120 de notre Laboratoire, équipé lui aussi d'une anticathode de cuivre. La géométrie INEL (détecteur courbe) permet une acquisition simultanée suivant toutes les valeurs de  $\theta$  comprises entre  $10^\circ$  et  $120^\circ$  ( $2\theta$ ), l'échantillon étant lui-même en rotation.

## 3. Spectroscopie d'absorption infrarouge

### 3.1. Principe

La spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR pour *Fourier Transformed InfraRed spectroscopy*) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des



liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau (pour plus de détails, cf. annexe 1) [76-78].

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement, ce qui se traduit par une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption.

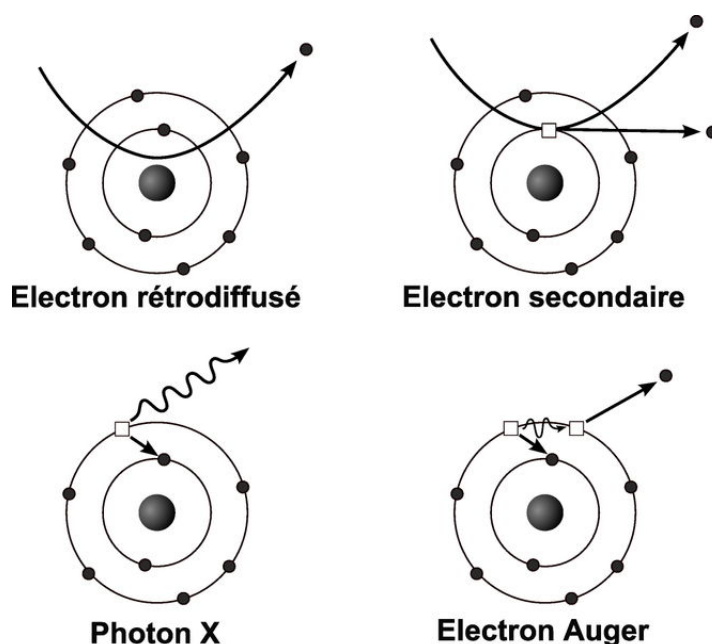
### 3.2. Protocole expérimental

Les échantillons doivent se présenter sous forme de pastilles. Pour cela, les matériaux sont finement broyés et mélangés avec du KBr (bromure de potassium), qui est transparent dans l'infrarouge et dont le rôle est de servir de matrice. Le rapport matériau / KBr est de 10% contre 90% en masse dans les pastilles. L'analyse par infrarouge de nos matériaux a été réalisée sur un spectromètre à transformée de Fourier Bruker Equinox 55. La transmission infrarouge a été déterminée pour le domaine de nombre d'onde  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  avec une résolution de  $2\text{ cm}^{-1}$ .

## 4. Microscopie électronique à balayage

### 4.1. Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons-matière ; un faisceau d'électrons primaires vient frapper la surface de l'échantillon et différents rayonnements sont ensuite émis par les atomes : électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger ou rayons X [79-80]. Les différents rayonnements émis apportent des informations complémentaires sur la matière dont est constitué l'échantillon (figure 3.1). Ces derniers sont détaillés en annexe 2.



**Figure 3.1.** Rayonnements émis par les atomes sous un faisceau d'électrons

## 4.2. Protocole expérimental

L'ensemble des analyses par microscopie électronique à balayage ont été réalisées au Centre de Microscopie Electronique à Balayage et microAnalyse (CMEBA) de l'université de Rennes 1.

### Préparation des échantillons

Les échantillons à analyser sont métallisés par dépôt d'or-paladium (pulvérisation cathodique, Jeol JFC 1100) avant d'être introduits dans la chambre d'analyse. Cette métallisation permet d'éviter une accumulation importante de charges à la surface des échantillons (isolants) et réduit la profondeur de pénétration du faisceau, ce qui améliore la qualité de l'image.

### Observation des échantillons

L'observation de la surface des échantillons et la réalisation d'images s'effectuent par la collecte des électrons secondaires (contraste topographique) ou rétro-diffusés (contraste chimique), émis par la surface du matériau.

Les micrographies présentées dans ce travail de thèse ont été réalisées sur le MEB à effet de champ Jeol JSM 6301F.

**Microanalyse – spectrométrie en énergie (EDS)**

Les microanalyses s'effectuent cette fois par collecte des photons X émis par le matériau. Nos échantillons ont été frappés par un faisceau d'électrons de 10 keV en énergie (au lieu de 20 keV en règle générale), afin de minimiser la profondeur analysée et d'obtenir des informations sur la composition de surface de nos échantillons. A titre indicatif et d'après la densité de nos verres, le faisceau pénètre à environ 1,5  $\mu\text{m}$  de profondeur à 10 keV, au lieu d'environ 4  $\mu\text{m}$  à 20 keV.

Les microanalyses ont été effectuées sur le MEB Jeol JSM 6400, équipé d'un spectromètre de dispersion d'énergie Oxford Link INCA.

**5. Spectrométrie d'émission optique****5.1. Principe**

La spectrométrie d'émission optique ou ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*) est une méthode physique d'analyse chimique permettant de doser la quasi-totalité des éléments simultanément. C'est une méthode quantitative dont la sensibilité est inférieure au ppm [81-83].

Les échantillons solides à analyser doivent se présenter sous forme de solution et sont donc préalablement dissous dans de l'acide. Les solutions sont ensuite nébulisées, puis ionisées par pulvérisation dans un plasma d'argon, c'est-à-dire que les atomes de la matière à analyser sont transformés par le plasma à très haute température (jusqu'à 8 000 K) en ions, dont les électrons périphériques sont excités.

Leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission de photons dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément. La lumière émise par l'élément recherché est mesurée par un détecteur circulaire. Ce dernier mesure simultanément les intensités émises entre 100 et 800 nm, grâce à deux réseaux et 19 capteurs CCD (*Charge Coupled Device*) disposés le long du cercle. L'intensité mesurée est enfin comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connue (solution étalon), analysé dans les mêmes conditions.

## 5.2. Protocole expérimental

Nos échantillons sont mis en solution dans de l'acide nitrique à 2 %. S'ils se présentent déjà sous forme liquide, 2 % d'acide nitrique est également rajouté dans les solutions. Une fois acidifiées, les solutions sont envoyées au nébulisateur, grâce à une pompe isostatique, puis pulvérisées en fines gouttelettes (spray) dans la chambre de nébulisation. Le spray est ensuite transporté vers le plasma grâce à un courant d'argon.

L'ICP-OES est une méthode comparative. Une solution d'acide nitrique à 2 % permet de faire le « zéro ». Pour chaque série d'analyses, six solutions étalons multiélémentaires de concentrations connues sont préparées de façon à encadrer les valeurs théoriques à analyser. L'analyse de ces solutions étalons permet ainsi de tracer des droites d'étalonnage en concentration pour chaque élément à mesurer dans nos échantillons. Les longueurs d'ondes caractéristiques des atomes émetteurs analysés sont choisies de façon à minimiser les interférences.

## 6. Résonance magnétique nucléaire

### 6.1. Principe

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique locale d'analyse structurale qui met à profit la présence de spins nucléaires non nuls, portés par de nombreux noyaux [84].

Lorsque les noyaux de spin non nuls sont en rotation sur eux-mêmes, ils génèrent un moment magnétique de spin. En physique quantique, un moment magnétique de spin  $\frac{1}{2}$ , placé dans un champ magnétique extérieur  $B_0$ , a deux états d'énergies possibles, appelés niveaux Zeeman. La RMN consiste alors à créer une transition d'un niveau à l'autre grâce à la mise en œuvre d'un champ radiofréquence. La condition de résonance est la suivante :

$$\nu_0 = \gamma \times \frac{B_0}{2\pi}$$

où  $\nu_0$  est la fréquence du champ radiofréquence,  $\gamma$  le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau étudié et  $B_0$  le champ magnétique principal.

Lorsque le noyau est entouré d'un cortège électronique, la fréquence de résonance devient :

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} (1 - \sigma)$$

où  $\sigma$ , coefficient d'écrantage, est la signature de l'environnement chimique local. Sur un spectre RMN, l'expérimentateur observe donc autant de raies de résonance qu'il y a de site différent pour l'élément dont le noyau est sondé. De plus, le coefficient d'écrantage est sans unité et sa valeur est de l'ordre de  $10^{-6}$ . Or, il est impossible de connaître avec une telle précision le champ statique  $B_0$ . Aussi, la valeur de la fréquence  $\nu$  est mesurée relativement à la fréquence  $\nu_{\text{ref}}$  d'une substance de référence. Afin de pouvoir s'affranchir de la valeur du champ  $B_0$  et de ses fluctuations, une nouvelle grandeur  $\delta$  a été définie :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \cdot 10^6$$

Cette nouvelle échelle de mesure  $\delta$  est appelée déplacement chimique et s'exprime en ppm [85].

Compte tenu des fortes interactions inhérentes aux matériaux à l'état solide, la RMN a longtemps été difficile à mettre en œuvre dans la matière condensée. Depuis une vingtaine d'années, avec la montée en champ des spectromètres et la mise au point des techniques dites de haute résolution, la RMN a connu un essor sans précédent pour l'étude d'échantillons à l'état solide. Elle est maintenant devenue une technique d'analyse structurale incontournable, en particulier pour les matériaux amorphes comme les verres.

Parmi ces techniques dites de haute résolution, la rotation à l'angle magique (MAS pour Magic Angle Spinning) est mise en œuvre en routine. Elle permet de supprimer l'interaction dipolaire, à l'origine de l'élargissement des raies, et de moyenniser l'interaction de déplacement chimique. Les spectres ainsi enregistrés sont alors plus proches de ceux observés en solution et présentent une résolution suffisante pour distinguer les différents environnements chimiques des éléments dont les noyaux sont étudiés. Expérimentalement, le MAS consiste à mettre l'échantillon en rotation autour d'un axe à  $54^\circ$  par rapport à  $B_0$  (angle magique) et à des vitesses pouvant atteindre 30 kHz.

## 6.2. Protocole expérimental

### Préparation des échantillons

Les échantillons sont finement broyés, puis la poudre est placée dans des rotors en zircone de 3 mm de diamètre et 15mm de hauteur. Les rotors sont ensuite placés dans le spectromètre et mis en rotation.

### Conditions expérimentales d'acquisition

Les paramètres caractéristiques de chaque noyau et les conditions expérimentales d'acquisition des spectres sont regroupés dans le tableau 3.1.

Les spectres RMN-MAS ont été enregistrés grâce au spectromètre haute résolution de RMN du solide Bruker Avance 300 (7T), au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) de l'université de Rennes 1 et sous la responsabilité de Marie Le Floch. Ils ont été traités avec le programme *dm20071105*, mis au point par le groupe de Dominique Massiot du CRMHT à Orléans [86].

Noyaux	$^{29}\text{Si}$	$^{31}\text{P}$
$\nu$ résonnance (MHz)	59,6	121,5
Vitesse de rotation (Hz)	10000	10000
Temps de pulse ( $\mu\text{s}$ )	2	2
Temps mort (s)	10	5
Référence	TMS	$\text{H}_3\text{PO}_4$

**Tableau 3.1.** Conditions expérimentales d'acquisition et noyaux de référence



## Chapitre 4

# Synthèse et caractérisations des verres bioactifs purs et dopés

### 1. Synthèse par fusion des verres bioactifs

Les verres bioactifs étudiés ont été synthétisés par la méthode de fusion à haute température, présentée dans le Chapitre 1. L'originalité de ce travail repose sur l'introduction, dans la matrice des verres, d'éléments possédant des propriétés physiologiques intéressantes pour des applications dans le domaine des biomatériaux.

#### 1.1. Choix des compositions et des éléments introduits

Afin d'observer l'influence de l'introduction d'éléments en faibles quantités dans la matrice et de valider notre protocole de synthèse, une composition dite de référence a tout d'abord été étudiée. Il s'agit d'une composition proche de celle du Bioglass<sup>®</sup> 45S5 de Larry Hench, que nous avons appelé 46S6. Cette composition a été synthétisée pure, puis dopée en magnésium, zinc ou strontium. Ces éléments, présentés dans le Chapitre 1, ont été introduits séparément, puis simultanément dans la matrice du verre.

Les compositions étudiées sont présentées dans le tableau 4.1. Les éléments dopants ont été introduits dans une gamme de teneurs comparables aux teneurs moyennes de ces éléments dans les tissus osseux humains, soit en % massique :

- entre 0,4 et 1,2 % de magnésium,
- entre 0,02 et 0,1 % de zinc,
- entre 0,02 et 0,1 % de strontium.



	SiO <sub>2</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			
46S6	46	24	24	6			
Verres dopés en magnésium							
	SiO <sub>2</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MgO	% Mg	
46S6Mg40	46	23,67	23,67	6	0,66	<b>0,4</b>	
46S6Mg60	46	23,5	23,5	6	1	<b>0,6</b>	
46S6Mg80	46	23,33	23,33	6	1,33	<b>0,8</b>	
46S6Mg100	46	23,17	23,17	6	1,66	<b>1</b>	
46S6Mg120	46	23	23	6	2	<b>1,2</b>	
Verres dopés en zinc							
	SiO <sub>2</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	ZnO	% Zn	
46S6Zn2	46	23,99	23,99	6	0,025	<b>0,02</b>	
46S6Zn4	46	23,975	23,975	6	0,05	<b>0,04</b>	
46S6Zn6	46	23,96	23,96	6	0,075	<b>0,06</b>	
46S6Zn8	46	23,95	23,95	6	0,1	<b>0,08</b>	
46S6Zn10	46	23,94	23,94	6	0,12	<b>0,1</b>	
Verres dopés en strontium							
	SiO <sub>2</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SrO	% Sr	
46S6Sr2	46	23,99	23,99	6	0,02	<b>0,02</b>	
46S6Sr4	46	23,975	23,975	6	0,05	<b>0,04</b>	
46S6Sr6	46	23,965	23,965	6	0,07	<b>0,06</b>	
46S6Sr8	46	23,95	23,95	6	0,1	<b>0,08</b>	
46S6Sr10	46	23,94	23,94	6	0,12	<b>0,1</b>	
Verres dopés avec les 3 éléments simultanément							
	SiO <sub>2</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	% Mg	% Zn	% Sr
46S6 Sup	46	22,88	22,88	6	<b>1,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
46S5 Os	46	23 ,38	23 ,38	6	<b>0,5</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>

**Tableau 4.1.** Compositions en oxyde des verres bioactifs purs et dopés (% massique)

## 1.2. Protocole de synthèse

Pour la synthèse du verre 46S6, les quantités appropriées de silicate de calcium, de silicate de sodium et de phosphate de sodium sont pesées selon les proportions massiques suivantes :

- $\text{CaSiO}_3$  : 49,51 %
- $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  : 42,06 %
- $\text{NaPO}_3$  : 8,43 %

Les poudres sont ensuite placées pendant 45 min dans un mélangeur planétaire. Cette étape garantit un mélange homogène des produits de départ, sans ségrégation entre composants. La fusion des poudres s'effectue par calcination à 1300°C pendant 3h dans un creuset en platine afin d'éviter toute pollution. Le mélange réactionnel fondu est ensuite coulé dans des moules en laiton préchauffés à 500°C et les verres ainsi synthétisés sont recuits pendant 4h à la température de transition de vitreuse afin d'évacuer les contraintes mécaniques résiduelles. A l'issue du recuit, les verres sont refroidis jusqu'à la température ambiante selon une rampe de 1°C.min<sup>-1</sup>. Les verres bruts de fusion se présentent sous la forme de cylindre de 13 mm ou 15 mm de diamètre (selon les applications) et d'une dizaine de mm de hauteur.

Les verres dopés ont été synthétisés selon le même protocole ; les produits supplémentaires utilisés sont l'oxyde de magnésium, l'oxyde de zinc et le carbonate de strontium.

	Formule	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Pureté (%)	Fournisseur
Calcium silicate meta	$\text{CaSiO}_3$	116,16	-	Alfa Aesar
Sodium metasilicate pentahydraté	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	212,14	97	Sigma
Trisodium trimetaphosphate	$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$	305,88	95-97	Sigma
Magnesium oxyde	$\text{MgO}$	40,30	99+	Aldrich
Zinc oxyde	$\text{ZnO}$	81,38	99	Prolabo
Strontium carbonate	$\text{SrCO}_3$	147,63	99,9	Aldrich

**Tableau 4.2.** Caractéristiques des produits chimiques utilisés

Les caractéristiques des produits de départ utilisés sont regroupées dans le tableau 4.2. Le silicate de sodium a été préalablement déshydraté par traitement thermique de 2h à 200°C ; une analyse thermogravimétrique du produit a confirmé le départ de l'ensemble des molécules d'eau lors de ce traitement.

Chacune des 18 compositions étudiées a nécessité une mise au point des différents paramètres de synthèse. La détermination de la température de recuit a demandé une attention particulière puisque cette phase délicate de recuit a une influence prépondérante sur la stabilité mécanique des verres. Une analyse thermique a donc été effectuée pour chacune des compositions, afin d'optimiser le choix de cette température et d'améliorer la qualité des matériaux synthétisés.

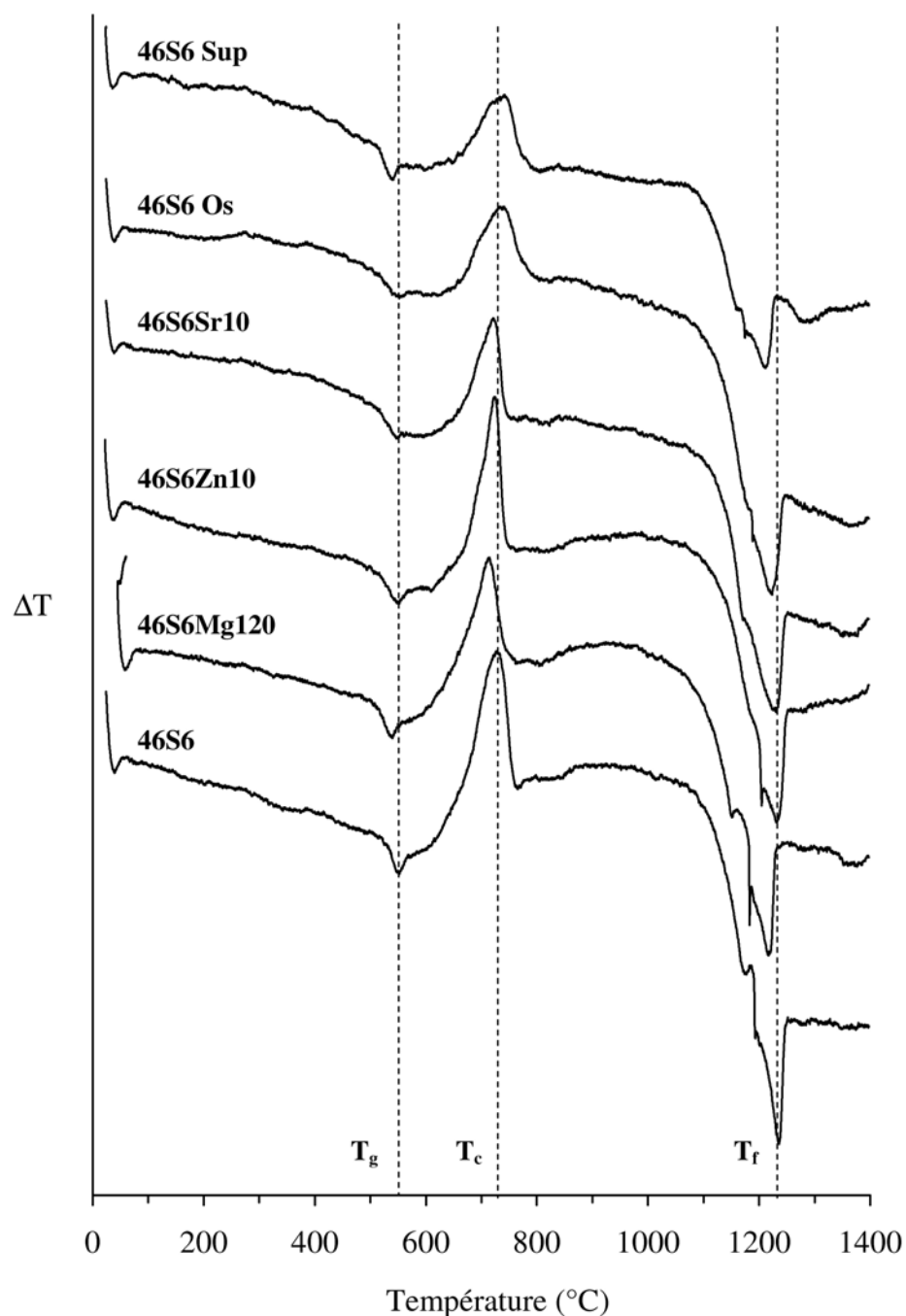
## **2. Caractérisations des verres bioactifs synthétisés**

Les six principales compositions étudiées ont été caractérisées par les différentes méthodes présentées dans le Chapitre 3. Il s'agit du 46S6, des compositions en teneurs hautes dopées avec un seul élément : 46S6Mg120, 46S6Zn10 et 46S6Sr10, ainsi que des deux compositions dopées avec les trois éléments simultanément : 46S6 Os et 46S6 Sup.

### **2.1. Caractérisation par analyse thermique différentielle**

La figure 4.1 présente les courbes d'analyse thermique différentielle (ATD) obtenues pour ces six compositions principales. L'acquisition de ces courbes permet de mettre en évidence le phénomène de transition vitreuse et de déterminer les températures caractéristiques du verre.

Ces dernières - température de transition vitreuse  $T_g$ , température de cristallisation  $T_c$  et température de fusion  $T_f$  - sont regroupées dans le tableau 4.3. Les températures  $T_c$  et  $T_f$  correspondent aux températures de sommet des pics de cristallisation et de fusion. Les pics endothermiques caractéristiques de la fusion des verres, présentent une légère séparation qui peut être attribuée à la présence de deux phases cristallines différentes.



**Figure 4.1.** Courbes ATD des verres synthétisés

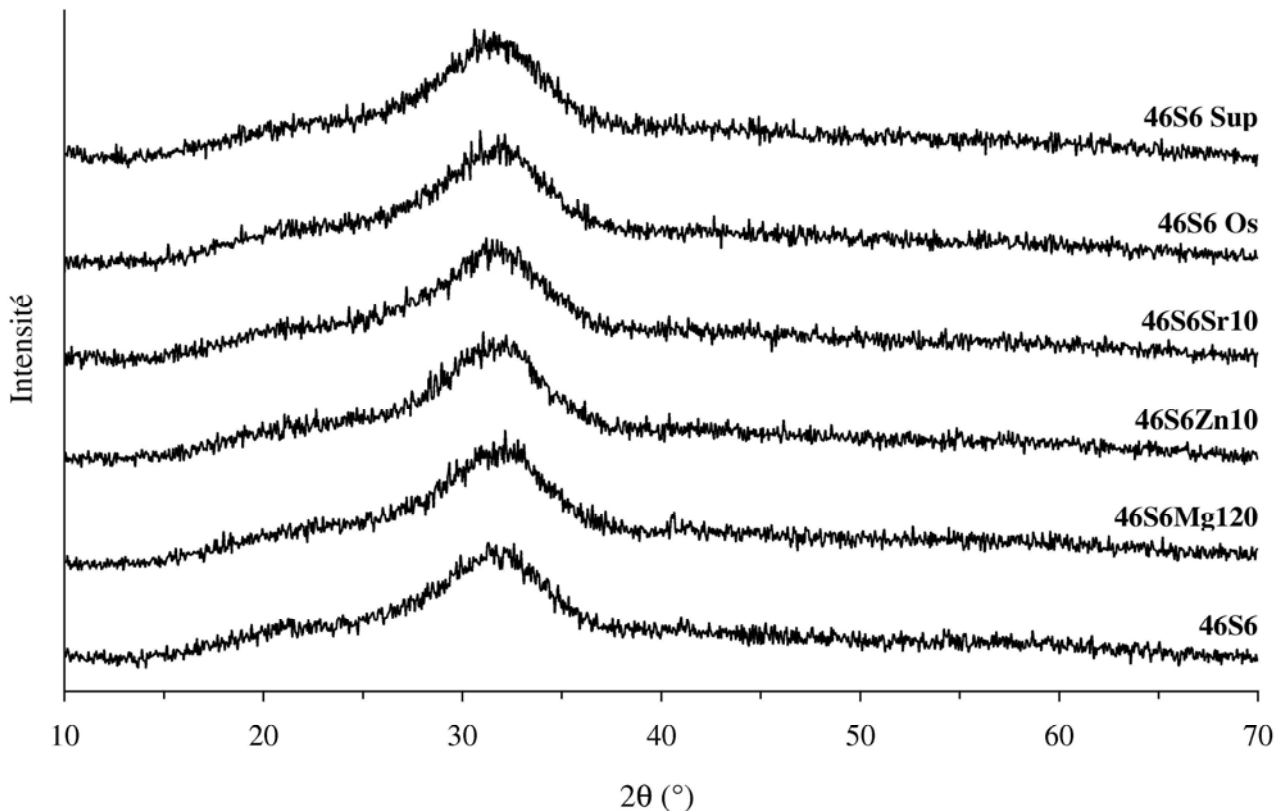
Ces analyses ont permis de déterminer les températures des recuits, identiques aux températures de transition vitreuse, effectués lors de la synthèse des verres. L'introduction de MgO, connu pour son rôle de fondant dans l'industrie verrière, semble abaisser la température de fusion des verres. Cependant, étant donné les faibles quantités d'éléments introduites, il est difficile de tirer des conclusions significatives quant aux variations de températures observées dans le tableau 4.3.

Températures (°C)	$T_g$	$T_c$	$\Delta T = T_c - T_g$	$T_f$
46S6	539	731	192	1225
46S6Mg120	522	712	190	1218
46S6Zn10	536	733	197	1230
46S6Sr10	522	721	199	1230
46S6 Os	538	733	195	1218
46S6 Sup	523	741	218	1208

**Tableau 4.3.** Températures caractéristiques des verres étudiés

## 2.2. Caractérisation par diffraction des rayons X

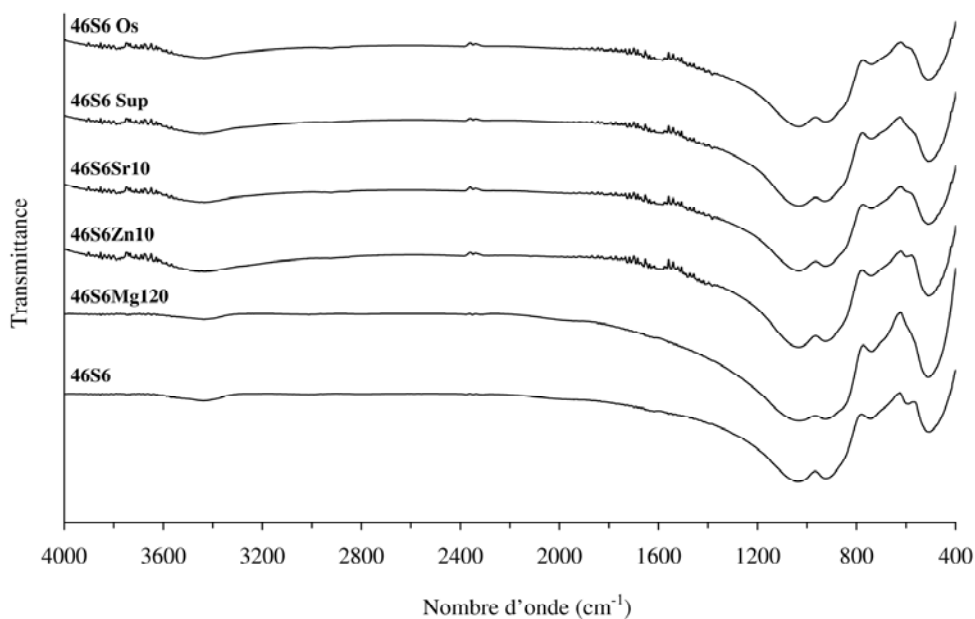
Les diagrammes de diffraction des différents verres synthétisés présentés sur la figure 4.2 mettent en évidence un halo de diffraction allant de 20 à 35° (2 $\theta$ ). Ce halo de diffraction est caractéristique des phénomènes de diffusion dans les matériaux amorphes et traduit l'absence d'ordre à longue distance dans la matrice de nos matériaux.

**Figure 4.2.** DRX des verres synthétisés

Seuls les diffractogrammes obtenus pour les 6 principales compositions sont représentés sur la figure 4.2 car les autres compositions étudiées présentent un profil de diffraction similaire.

### 2.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Les verres préparés présentent peu de différences entre eux et les spectres IR obtenus sont très proches de celui du 45S5, synthétisé par Larry Hench [87]. En effet, le spectre IR du verre 46S6 avant immersion (figure 4.3) présente de larges bandes d'absorption des silicates, caractéristiques d'un réseau de silice [88-90]. Ainsi, une première bande à  $506\text{ cm}^{-1}$  indique une vibration de déformation angulaire Si-O-Si entre les tétraèdres  $\text{SiO}_4$ . Trois autres bandes correspondent quant à elles à une vibration d'élongation de la liaison Si-O dans les tétraèdres  $\text{SiO}_4$ , respectivement à 745, 923 et  $1036\text{ cm}^{-1}$ . Un très léger épaulement est observé à  $846\text{ cm}^{-1}$ , qui peut être également attribué à une vibration d'élongation de Si-O dans les tétraèdres  $\text{SiO}_4$ . Enfin, une légère bande à  $590\text{ cm}^{-1}$  correspond à une vibration de déformation angulaire du groupement O-P-O. Le réseau vitreux du verre 46S6 est donc majoritairement un réseau de silice où le phosphore est présent en petite quantité.

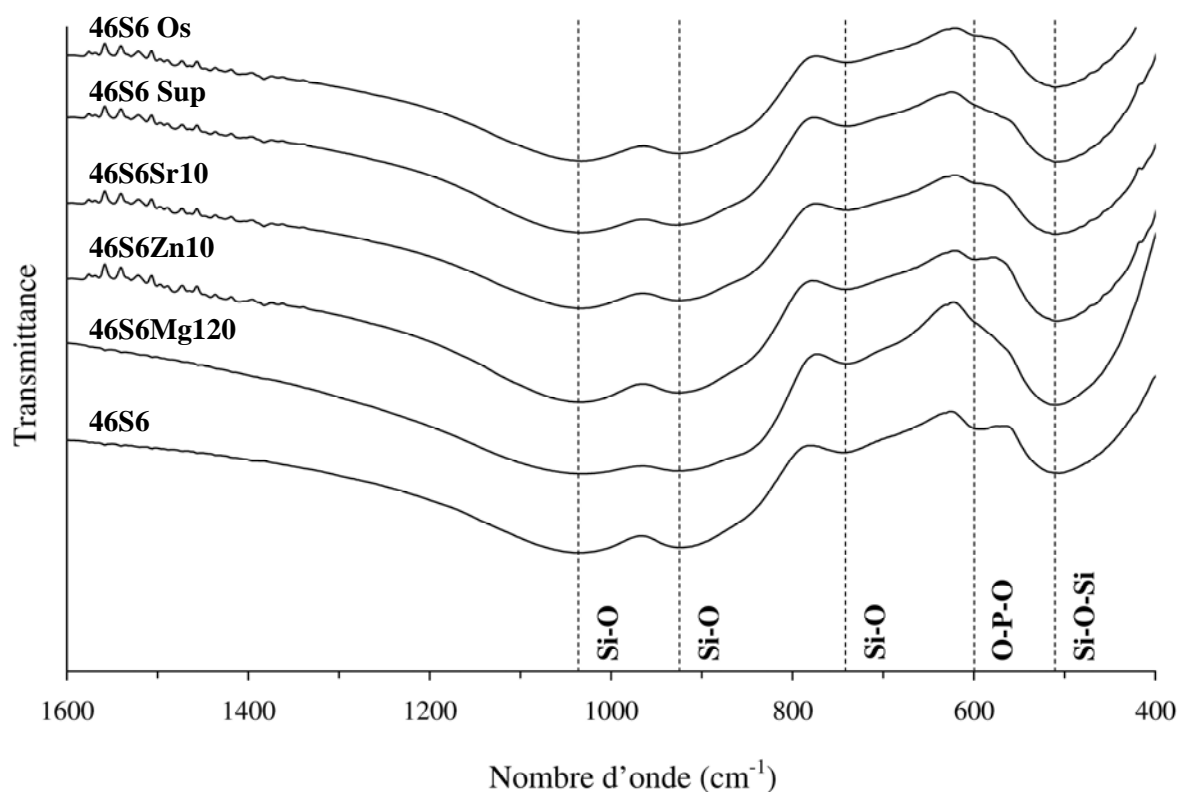


**Figure 4.3.** Spectres IR des verres synthétisés

	Si-O-Si	O-P-O	Si-O	Si-O	Si-O
46S6	506	590	745	923	1036
46S6Mg120	511	590	740	925	1035
46S6Zn10	507	598	742	929	1031
46S6Sr10	510	598	742	924	1037
46S6 Os	510	598	740	926	1032
46S6 Sup	510	598	741	925	1031

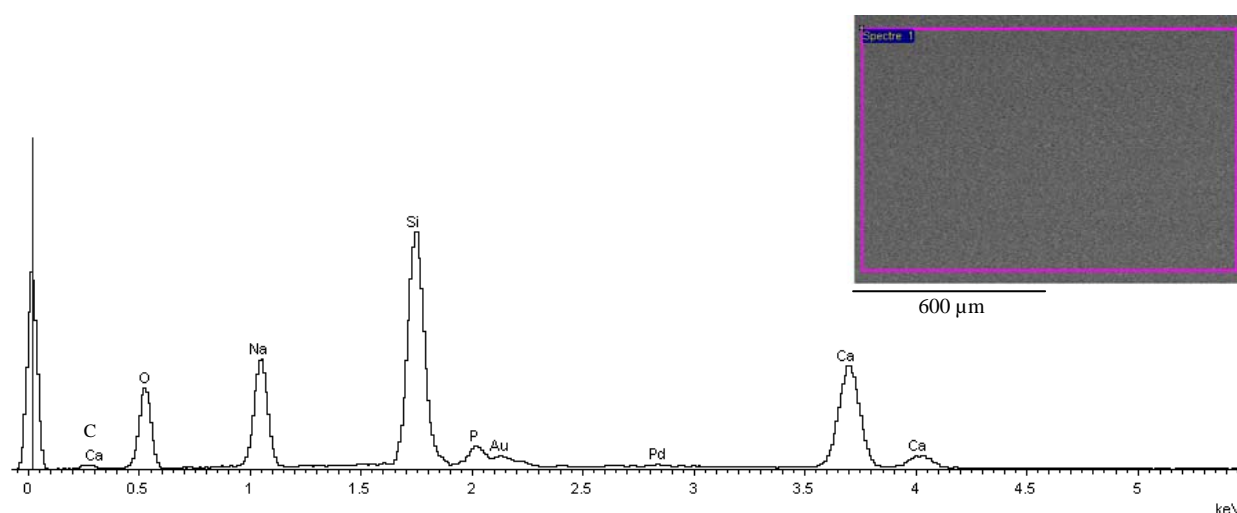
**Tableau 4.4.** Bandes d'absorption observées pour les différents verres étudiés

Le tableau 4.4 répertorie les bandes relevées sur les spectres d'absorption des différents verres étudiés. On constate que ces spectres sont très proches les uns des autres (figure 4.4). La seule différence notable concerne les spectres du 46S6Mg120 et 46S6 Sup : on observe un léger épaulement au lieu d'une bande à  $590\text{ cm}^{-1}$ . Cette différence est probablement due à la teneur en magnésium (1,2 %), identique pour ces deux compositions.

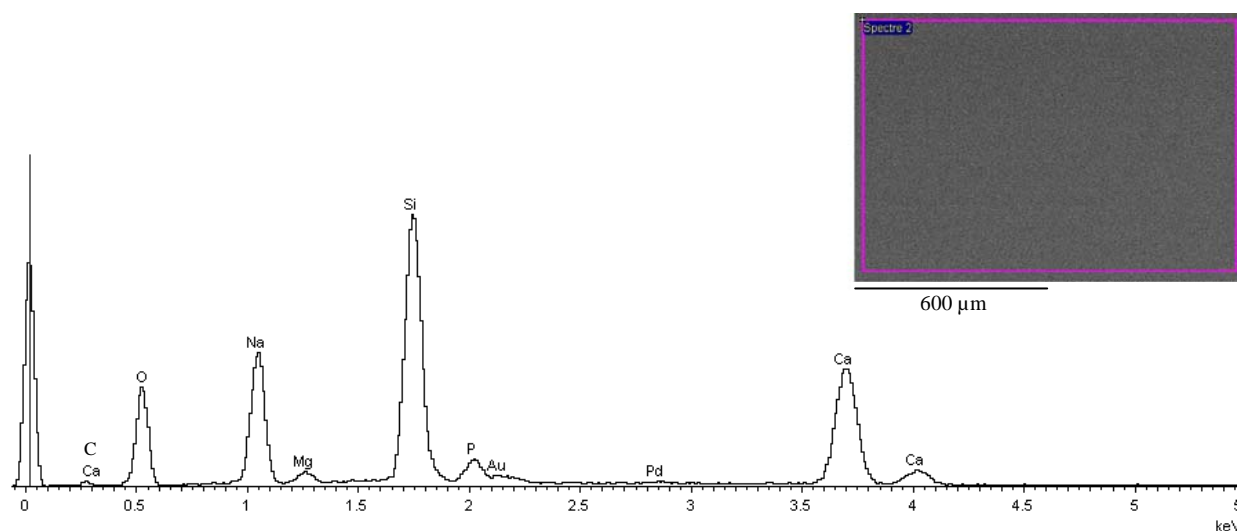
**Figure 4.4.** Détail des spectres IR des verres synthétisés

## 2.4. Etude des verres synthétisés par MEB couplé à l'EDS

Une face de chaque échantillon a été préparée par polissage au papier de carbure de silicium (jusqu'au papier 4000), afin d'offrir une surface plane, facilement observable au MEB et analysable par EDS. L'ensemble des échantillons observés présente une surface lisse et non poreuse et les analyses EDS sont en accord avec la composition attendue des verres. Les figures suivantes représentent la surface des différents échantillons synthétisés, ainsi que leur spectre EDS.

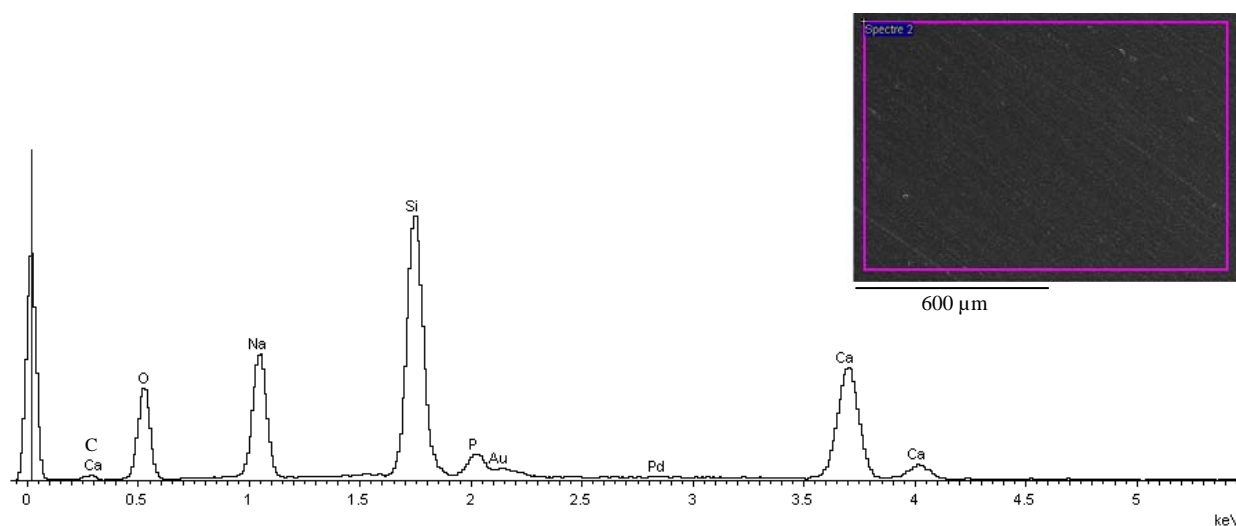


**Figure 4.5.** Spectre EDS du verre 46S6 et micrographie de la zone analysée

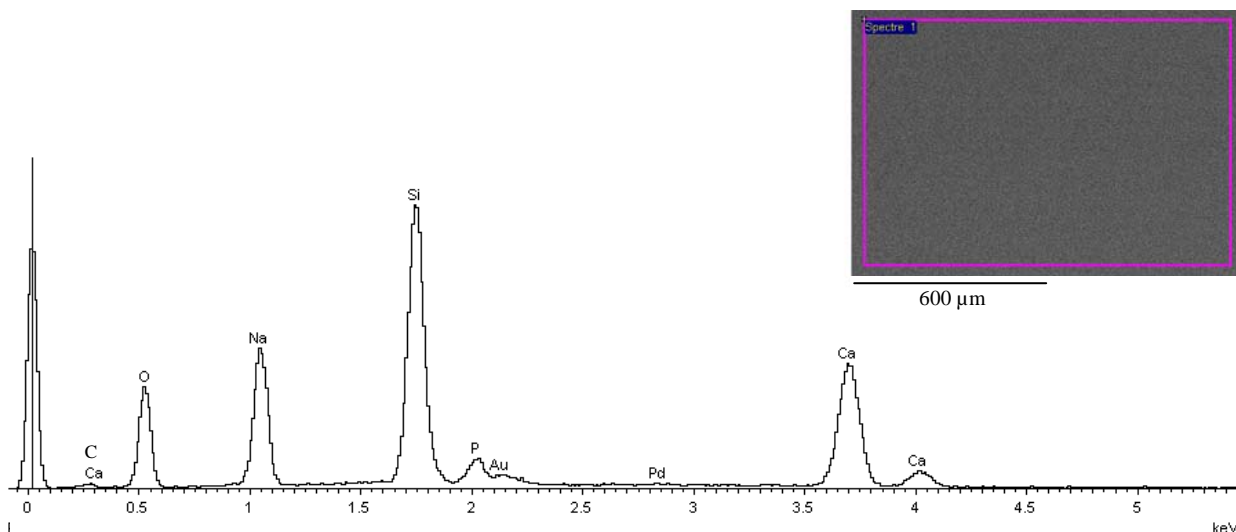


**Figure 4.6.** Spectre EDS du verre 46S6Mg120 et micrographie de la zone analysée





**Figure 4.7.** Spectre EDS du verre 46S6Zn10 et micrographie de la zone analysée



**Figure 4.8.** Spectre EDS du verre 46S6Sr10 et micrographie de la zone analysée

Ces différentes analyses présentent peu de différences. Le magnésium est détecté en faibles quantités sur la figure 4.5. Par contre, le zinc et le strontium sont introduits en trop petites quantités pour pouvoir être décelés par l'analyse EDS (figure 4.7 et 4.8). De plus, le strontium est connu pour avoir des raies d'interférence avec le calcium, ce qui diminue encore les possibilités de le détecter par cette méthode, même en étant introduit dans des proportions plus importantes. Les images de la surface des verres avant immersion apportent peu d'informations pour le moment, mais elles vont servir de référence pour l'observation des échantillons après immersion.

### **3. Bilan des résultats**

Avant immersion, peu de différences sont observées entre les différentes compositions de verre. Les résultats obtenus montrent que les matériaux synthétisés sont amorphes et homogènes en composition. Seul le verre dopé au magnésium présente un spectre d'absorption infrarouge légèrement différent et la présence de magnésium est révélée par les analyses EDS.

Afin de compléter cette caractérisation des verres avant immersion, une étude par RMN du solide sera réalisée. Ces analyses permettront de savoir si les éléments introduits dans la composition chimique ont une influence sur la structure même du verre. Les résultats de RMN seront présentés dans le Chapitre 12.



## Chapitre 5

### Etude *in vitro* des verres bioactifs – Protocole expérimental

L'étude *in vitro* de nos matériaux permet de recréer, en l'absence de cellules, des conditions favorables à la précipitation de l'hydroxyapatite à la surface des verres bioactifs. Nous nous sommes intéressés aux modifications de la surface des échantillons et à la compréhension des échanges ioniques ayant eu lieu à l'interface verre bioactif – milieu d'immersion.

#### 1. Choix du milieu utilisé

##### 1.1. Intérêts des tests *in vitro*

La double capacité d'un biomatériau à relarguer des concentrations adéquates de certaines espèces ioniques et à former à sa surface une couche d'hydroxyapatite lors du contact avec des fluides biologiques synthétiques, permet d'évaluer sa faculté à se lier aux tissus vivants [3]. Les tests *in vitro*, peu coûteux et faciles à mettre en œuvre, constituent une approche préliminaire du comportement d'un biomatériau. Ils permettent de donner une première évaluation de la bioactivité des matériaux. Si les matériaux étudiés présentent des propriétés intéressantes, cette étude sera alors complétée par des tests *in vitro* en présence de cellules, puis des tests *in vivo*.

Deux types de tests *in vitro* peuvent être réalisés : soit les tests statiques, soit les tests dynamiques [91]. La majorité des tests sont des tests statiques, ce qui signifie que la solution utilisée pour les tests n'est pas renouvelée au cours de l'expérimentation. L'autre méthode consiste à renouveler périodiquement la solution employée [92-93]. Enfin, dans certains cas, la solution circule de façon continue dans un réseau, ce qui permet un renouvellement constant de la solution en contact avec le biomatériau [94].

Cependant il est difficile de dire quel type de test simule le mieux les conditions d'une implantation. En effet, les fluides biologiques circulent à l'interface tissus-biomatériau, mais l'étendue de cette circulation n'est pas encore bien définie. Néanmoins, il a été montré que la méthode statique induit une saturation plus rapide de la solution, et ainsi une précipitation plus rapide de l'hydroxyapatite [95].

## 1.2. Présentation du SBF

Les tests *in vitro* ont été effectués par immersion des échantillons dans une solution de liquide physiologique simulé ou SBF (pour Simulated Body Fluid). Il s'agit d'une solution mise au point en 1990 par Kokubo [96] et de composition ionique voisine de celle du plasma sanguin humain (tableau 5.1).

Ions	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

**Tableau 5.1.** Concentrations ioniques du SBF et du plasma sanguin humain (mM)

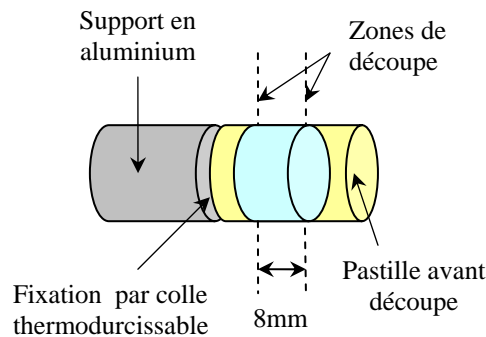
Comme le montre le tableau 5.1, le SBF utilisé présente un excès d'ions Cl<sup>-</sup>, ainsi qu'un manque d'ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, par rapport au plasma sanguin humain. La teneur basse en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> s'explique par le fait que le carbonate de calcium a tendance à précipiter dans le SBF ; la diminution de la concentration en ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> supprime alors cette précipitation. En ce qui concerne la concentration en ions Cl<sup>-</sup>, aucune modification de la stabilité du SBF n'a été observée si on en introduit une teneur identique à celle du plasma humain dans le SBF. La composition initiale (tableau 5.1) du SBF a alors été conservée et son protocole de synthèse détaillé, afin de rendre sa synthèse aisée et reproductible [97].

Ainsi, le choix de cette solution de SBF permet de créer, en l'absence de cellules, des conditions favorables à la précipitation d'hydroxyapatite à la surface de nos verres lors des tests *in vitro*. Le protocole de synthèse du SBF est présenté en annexe 4 [97].

## 2. Protocole expérimental

### 2.1. Préparation des échantillons

Préalablement à leur immersion dans le SBF, les verres bioactifs synthétisés sont découpés à l'aide d'une tronçonneuse de précision (Struers, Secotom – 10) afin de former des cylindres de 13 mm de diamètre et 8 mm de hauteur. La mise en place des échantillons s'effectue suivant la figure 5.1., le support en aluminium étant fixé dans le porte échantillon de la tronçonneuse.



**Figure 5.1.** Disposition des échantillons pour la découpe

Une fois découpés, les cylindres de verre sont enrobés dans de la résine organique. Quatre échantillons sont enrobés simultanément dans des moules en téflon de diamètre intérieur 4 cm. Après 24 heures (temps de polymérisation de la résine), on sépare les quatre cylindres. Chaque échantillon est alors poli en milieu humide, afin que seule une face du verre bioactif soit en contact avec le liquide physiologique lors des essais *in vitro*. De cette manière, la surface de contact à l'interface verre bioactif – SBF est identique pour tous les échantillons. Ce polissage au papier de carbure de silicium (jusqu'au grain 2400) permet également d'éliminer la couche de surface qui peut avoir été polluée pendant la découpe et la manipulation des cylindres.

Dans un second temps, nous avons travaillé sur des poudres de verres, afin de mieux observer les modifications structurales de la matrice vitreuse au cours des essais *in vitro*. En effet, les poudres de verre présentent une surface d'échange plus importante avec le SBF que les échantillons massifs et réagissent donc plus vite. La granulométrie des poudres étudiées est comprise entre 40 et 63  $\mu\text{m}$ .

## 2.2. Immersion des échantillons

### 2.2.1. Pastilles de verres bioactifs

Les échantillons enrobés de verres bioactifs ont été immergés dans 8 ml de SBF et maintenus à 37°C sous agitation contrôlée (50 tours/min). Nous avons défini 10 délais allant de 1 heure à 30 jours afin d’observer les modifications des matériaux à court et long terme :

- courts délais : 1 heure, 2 heures, 4 heures, 8 heures et 16 heures,
- longs délais : 1 jour, 2 jours, 5 jours, 15 jours, 30 jours et 60 jours.

Les essais se sont déroulés selon la méthode statique, sans renouvellement du SBF et chaque test a été réalisé en triplicata. A l’issue de chaque délai, les échantillons sont prélevés, rincés soigneusement à l’eau distillée, puis séchés à température ambiante. Le SBF est également conservé et stocké au réfrigérateur afin de pouvoir être analysé par ICP-OES. Son analyse ultérieure permettra ainsi de mettre en évidence les échanges ioniques ayant eu lieu entre le matériau et le milieu d’immersion.

### 2.2.2. Poudres de verres bioactifs

Pour chaque composition de verre, 250 mg de poudre de granulométrie 40-63  $\mu\text{m}$  ont été immergés dans 50 ml de SBF. Chaque test a été réalisé en duplicata pour quatre délais : 1 jour, 3 jours, 7 jours et 15 jours. De la même manière que pour les pastilles, le SBF est prélevé et stocké à l’issue de chaque délai et la poudre est séchée à température ambiante.

Cette série d’essais a été réalisée afin de mieux comprendre les modifications structurales du réseau vitreux au cours du processus de bioactivité. Une fois séchée, les poudres ont été analysées par différentes méthodes : RMN du solide, IR et MEB-EDS, et le SBF par ICP-OES.

## PARTIE 3

**Etude *in vitro*.**  
**Interactions verres**  
**bioactifs – milieu**  
**physiologique synthétique**





## Chapitre 6

### Etude de la bioactivité du verre 46S6

Les tests *in vitro* réalisés au cours de ce travail de thèse ont pour but de mettre en évidence et de comprendre la réactivité des verres étudiés, par le biais des modifications observées en surface. Dans ce chapitre seront présentées les caractérisations effectuées sur le verre 46S6 après immersion dans le SBF.

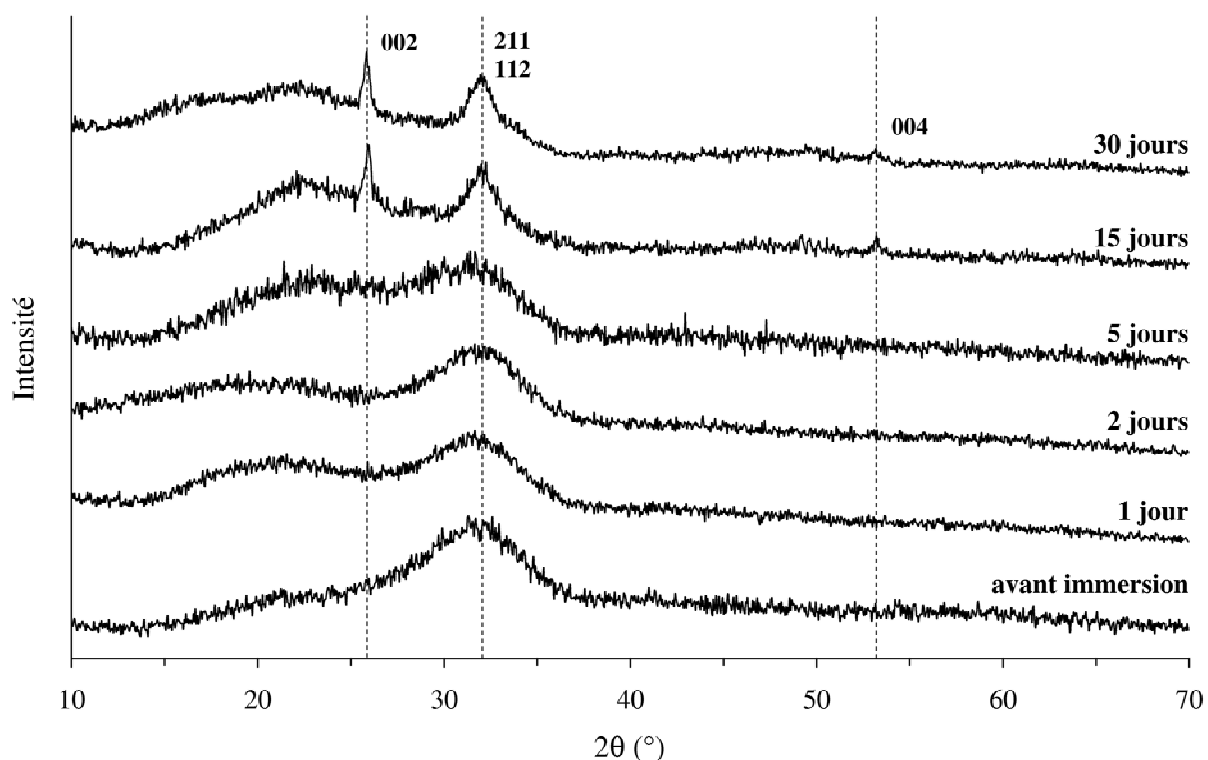
L'étude du verre de référence 46S6 permet de mettre en relief dans les chapitres suivants l'influence de l'introduction des éléments dopants sur la réactivité des verres après immersion. Cette étude sera complétée par la suite pour la compréhension des modifications structurales des verres après immersion dans le SBF (étude sur poudre), grâce à la RMN du solide (Chapitre 13).

#### 1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre 46S6 après immersion dans le SBF

##### 1.1. Analyse des surfaces par DRX

La surface des échantillons de verre a été caractérisée par diffraction des rayons X après 1, 2, 5, 15 et 30 jours d'immersion dans le SBF. Les courts délais d'immersion (de 1 heure à 16 heures d'immersion) ne sont pas présentés ici car la couche formée en surface des verres pour ces délais est trop mince pour pouvoir être étudiée par la diffraction des rayons X.

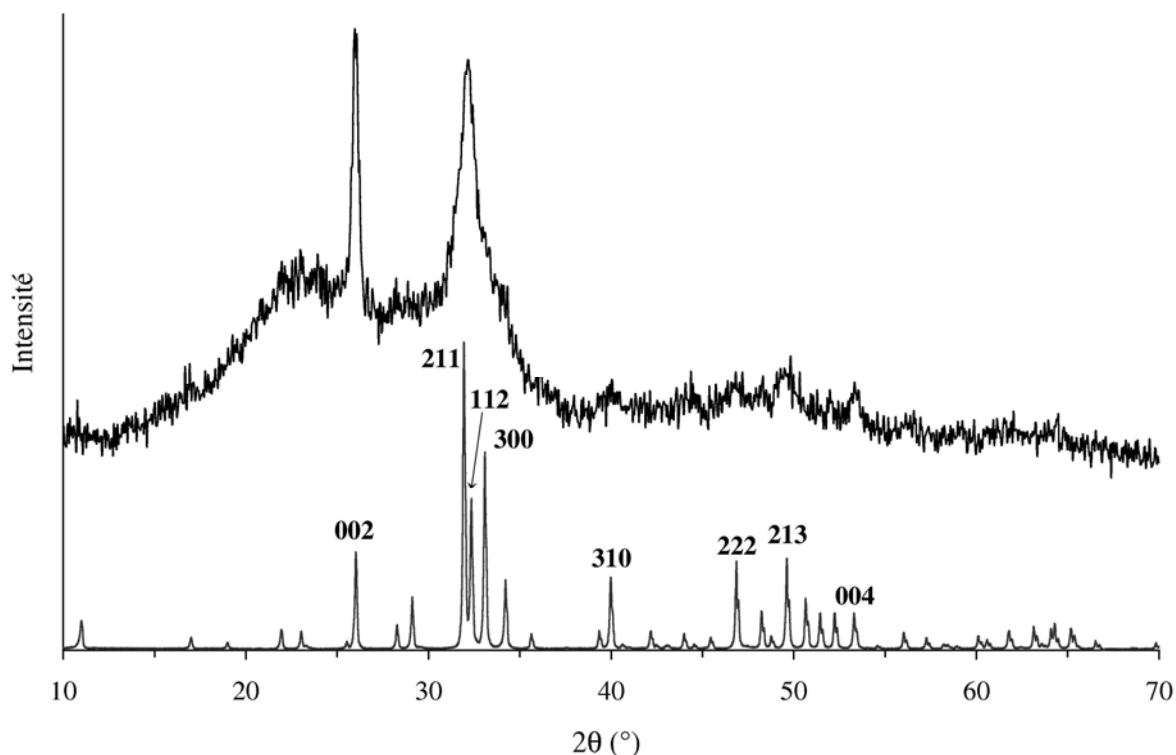
La figure 6.1 présente les diagrammes de diffraction de la surface du verre 46S6 après un temps d'immersion compris entre 1 et 30 jours. Il est nécessaire de noter la contribution majeure du bruit de fond, dû à la présence de la matrice vitreuse. Le rapport signal sur bruit est donc important. Pour chaque délai, le diagramme de diffraction présente le halo de diffraction de 20 à 40° (2 $\theta$ ), précédemment observé pour les verres avant immersion. Après 15 et 30 jours d'immersion, on constate l'apparition de raies de diffraction.



**Figure 6.1.** DRX de la surface du verre 46S6 après immersion dans le SBF

La figure 6.2 permet de comparer le diagramme de diffraction du verre 46S6 après 60 jours d'immersion et le diffractogramme de l'hydroxyapatite naturelle, pris comme référence, dans les mêmes conditions d'acquisition [98]. L'hydroxyapatite utilisée est issue de la calcination d'os bovins. Les principales raies de diffraction de l'hydroxyapatite sont indexées sur cette même figure (fiche JCPDF 09-432) [99].

Après 60 jours d'immersion, le diagramme de diffraction du 46S6 présente deux raies de diffraction principales à environ 26 et 32° (2θ). A 26° (2θ), la raie correspond à la réflexion du plan (002). Cette raie est plus intense sur le diagramme de diffraction du 46S6 après immersion que sur celui de l'hydroxyapatite naturelle. Cette différence d'intensité suggère une orientation préférentielle lors de la croissance des cristaux d'hydroxyapatite selon le plan (002). Le groupe de raies autour de 32° (2θ) correspond aux réflexions des plans (211), (112) et (300). Quatre raies de diffraction moins intenses sont également observées à 40, 47, 50 et 53° (2θ), qui correspondent respectivement aux réflexions des plans (310), (222), (213) et (004). L'orientation préférentielle est ainsi confirmée par l'observation de la raie secondaire du plan (004) à 53° (2θ), alors que son intensité sur le diagramme de l'hydroxyapatite naturelle, pris comme référence, est plus faible que celles des raies correspondant aux plans (222) ou (213).

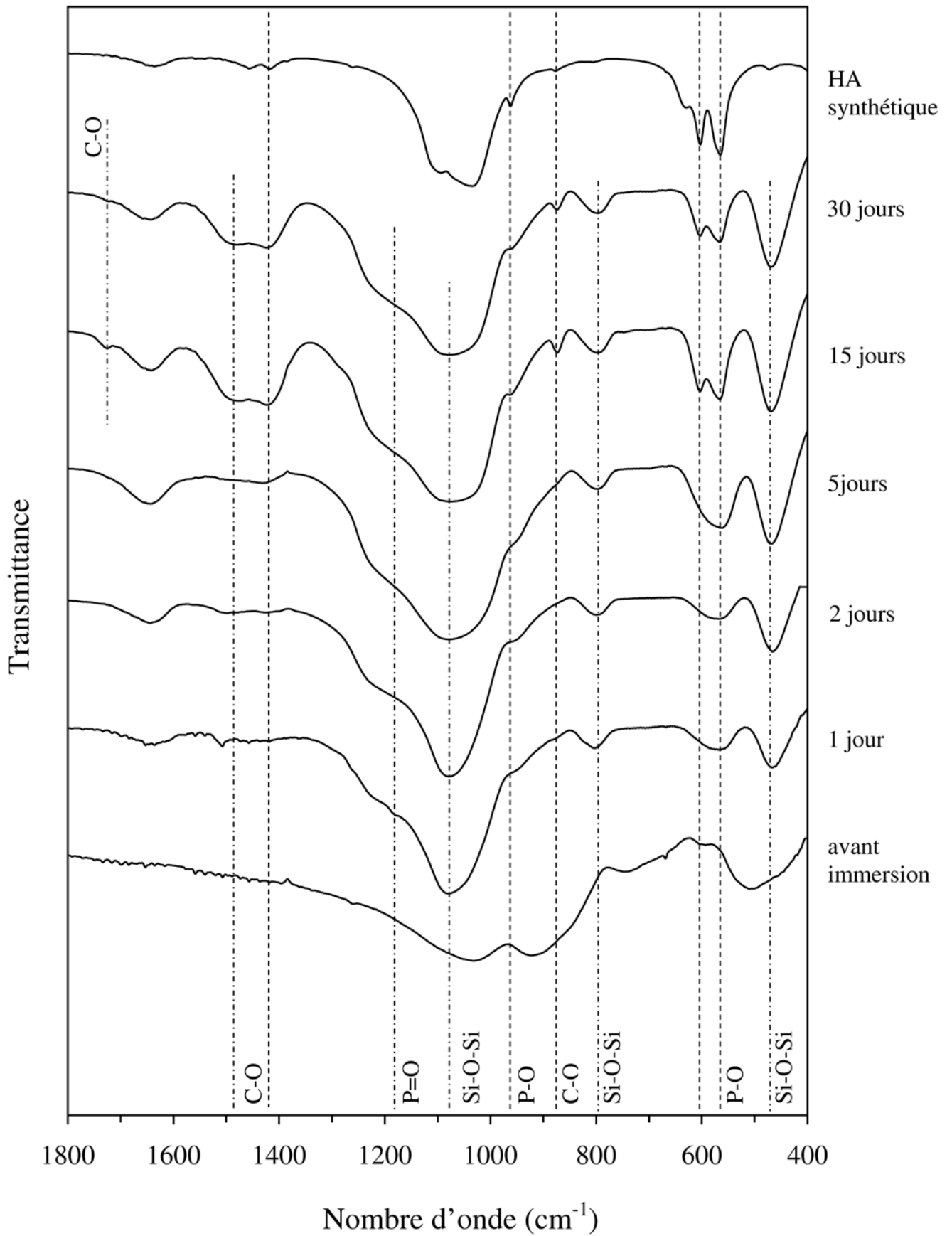


**Figure 6.2.** Comparaison entre les diffractogrammes du verre 46S6 après 60 jours d'immersion et de l'hydroxyapatite naturelle [98]

## 1.2. Analyse de la couche formée en surface par FTIR

Les spectres IR de la couche recueillie en surface du 46S6 après les différents temps d'immersion sont présentés sur la figure 6.3. L'hydroxyapatite synthétique utilisée comme référence est de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Calcium hydroxyde phosphate AR powder, Alfa).

Sur les spectres à 15 et 30 jours d'immersion, la présence de trois bandes P-O à 565, 603 et 961  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique des phosphates en phase cristalline. Ces trois bandes confirment la formation de phosphate de calcium cristallisée et sont communes aux bandes P-O de l'hydroxyapatite. De plus, il s'agit d'une couche carbonatée en raison de la présence de bandes C-O à 873, 1420 et 1470  $\text{cm}^{-1}$  [87]. Ces spectres possèdent également deux bandes Si-O-Si à 470 et 1075  $\text{cm}^{-1}$ , ce qui confirme la présence d'une sous-couche riche en  $\text{SiO}_2$ . Enfin, une très légère bande C-O est observée à 1725  $\text{cm}^{-1}$ . La bande d'absorption observée à 1640  $\text{cm}^{-1}$  correspond à l'une des bandes infrarouge du dioxyde de carbone atmosphérique.

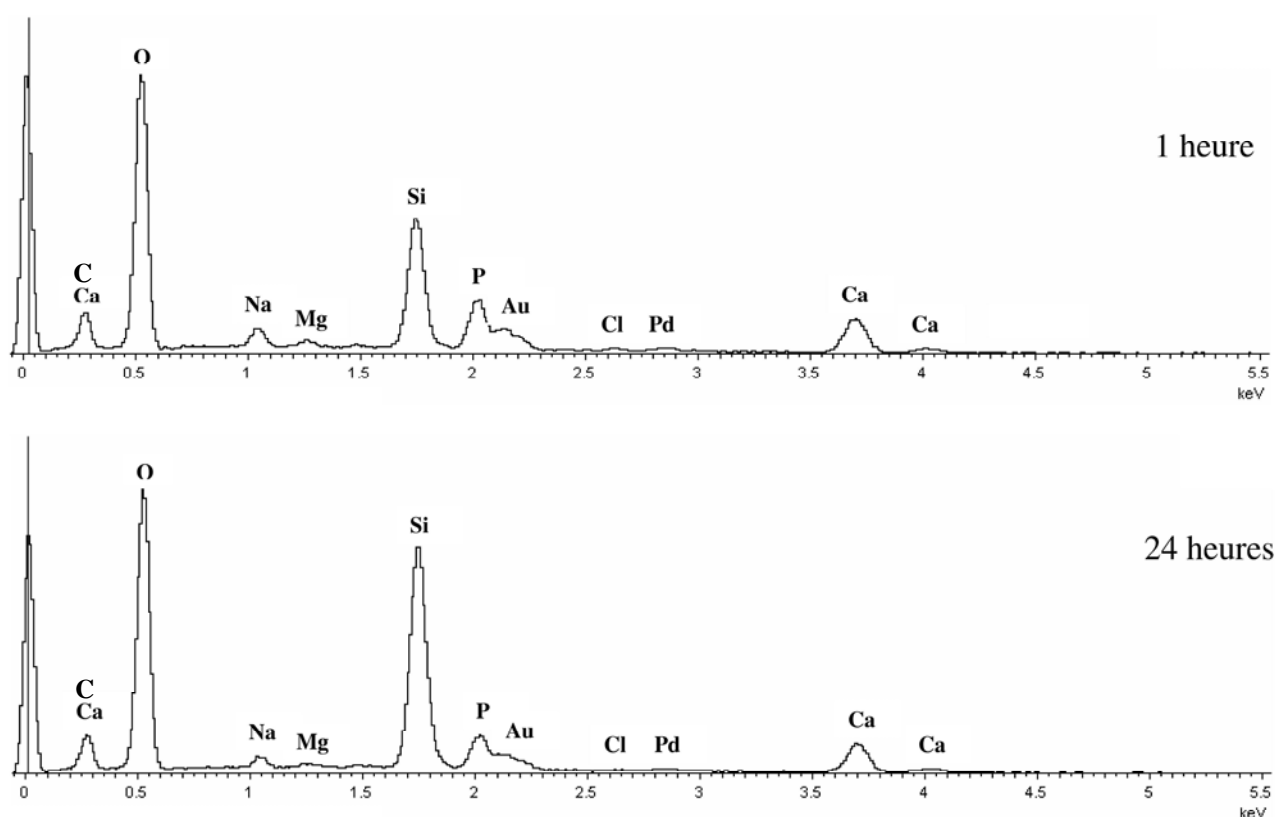


**Figure 6.3.** Spectres IR de la surface du verre 46S6 après immersion dans le SBF

### 1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion

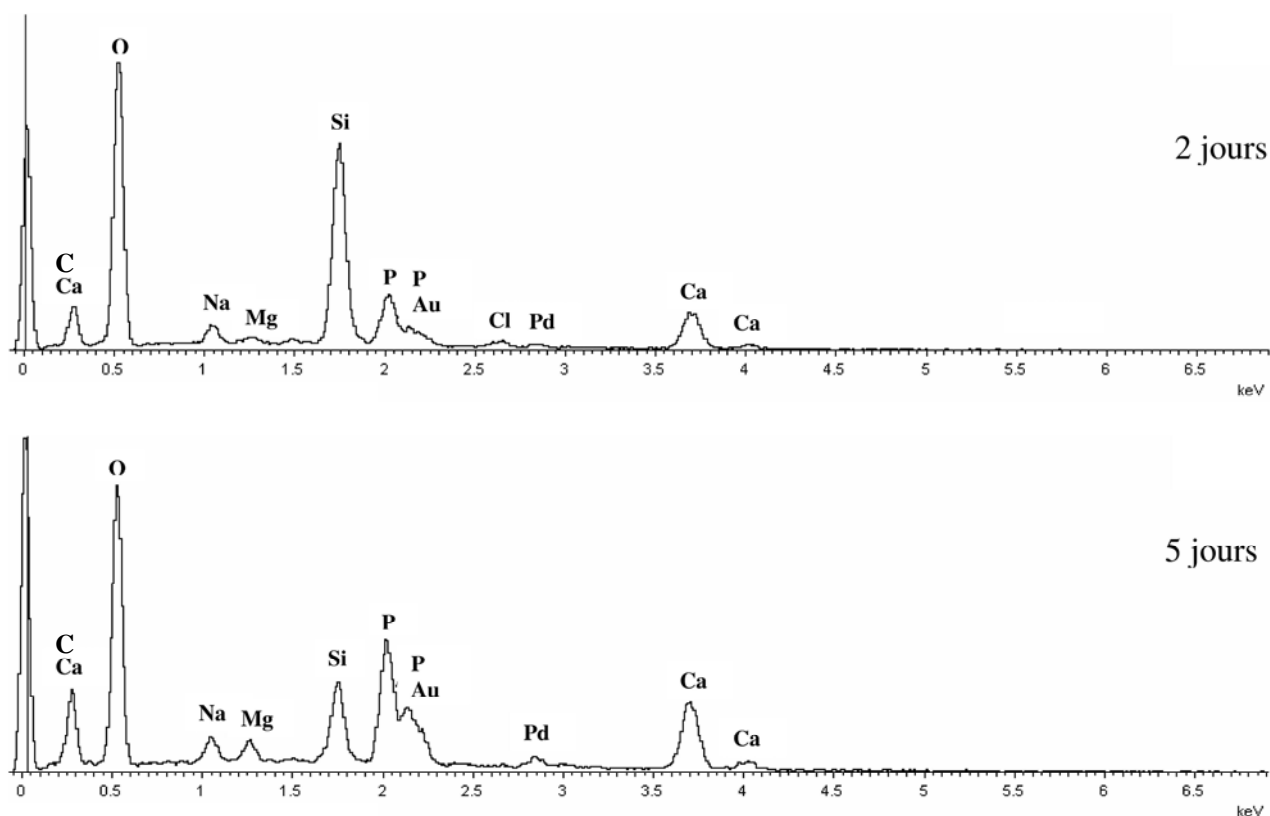
La figure 6.6 présente les micrographies ( $\times 10\,000$ ) de la surface du verre 46S6 pour huit délais d'immersion compris entre 1 heure et 30 jours. Après immersion, la surface du 46S6 présente de multiples craquelures, probablement apparues lors du séchage des échantillons, qui témoignent de la formation d'une couche.

Entre 1 heure et 2 jours, la couche formée à la surface du verre est constituée de particules sphériques compactées entre elles. Les fissures deviennent également plus larges et plus régulières quand le temps d'immersion augmente. Pour ces mêmes délais, l'analyse semi-quantitative par EDS indique la présence de larges quantités de silicium à la surface du verre (figures 6.4 et 6.5). L'évolution de la morphologie des fissures peut alors être corrélée à un épaissement de cette couche riche en silice avec l'augmentation des durées d'immersion.



**Figure 6.4.** Spectres EDS de la surface du 46S6 après 1 et 24 heures d'immersion

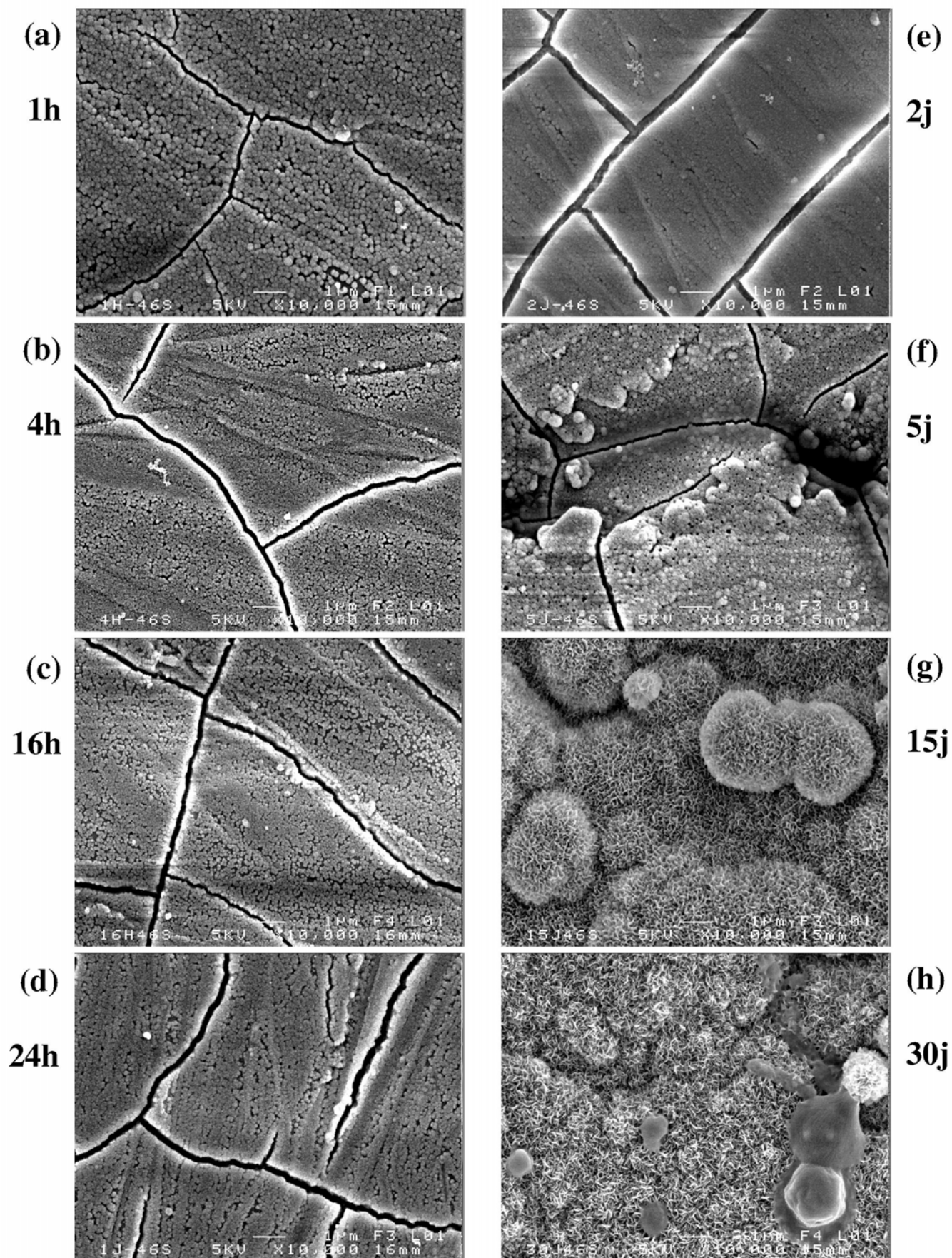
Sur les spectres EDS à partir de 5 jours d'immersion, la présence du calcium et du phosphore est détectée en quantité plus importante à la surface du verre 46S6. En même temps, la quantité de silicium présent en surface diminue (figure 6.5). La micrographie à 5 jours (figure 6.6-f) présente également une morphologie très différente des précédentes.



**Figure 6.5.** Spectres EDS de la surface du 46S6 après 2 jours et 5 jours d'immersion

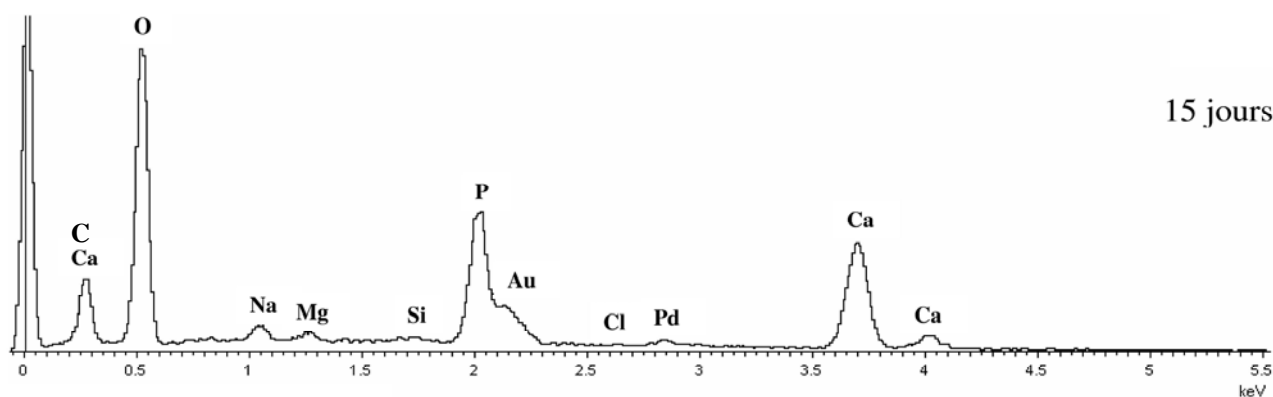
La formation d'une couche riche en phosphate de calcium est confirmée par les spectres EDS à 15 et 30 jours d'immersion : l'épaisseur de cette couche devient trop importante pour pouvoir détecter le silicium de la couche de  $\text{SiO}_2$  sous-jacente (figures 6.7 et 6.8). On observe également sur les micrographies à 15 et 30 jours d'immersion que la couche de phosphate de calcium est cristallisée. L'ensemble de ces observations sont en accord avec les diffractogrammes et les spectres IR obtenus pour les mêmes délais d'immersion.

La présence de magnésium est détectée dès les premiers délais d'immersion à la surface des verres. Avec l'augmentation du temps d'immersion, la quantité de magnésium en surface augmente légèrement. Le magnésium présent dans le SBF est donc incorporé dans la couche d'hydroxyapatite formée lors des tests *in vitro*.

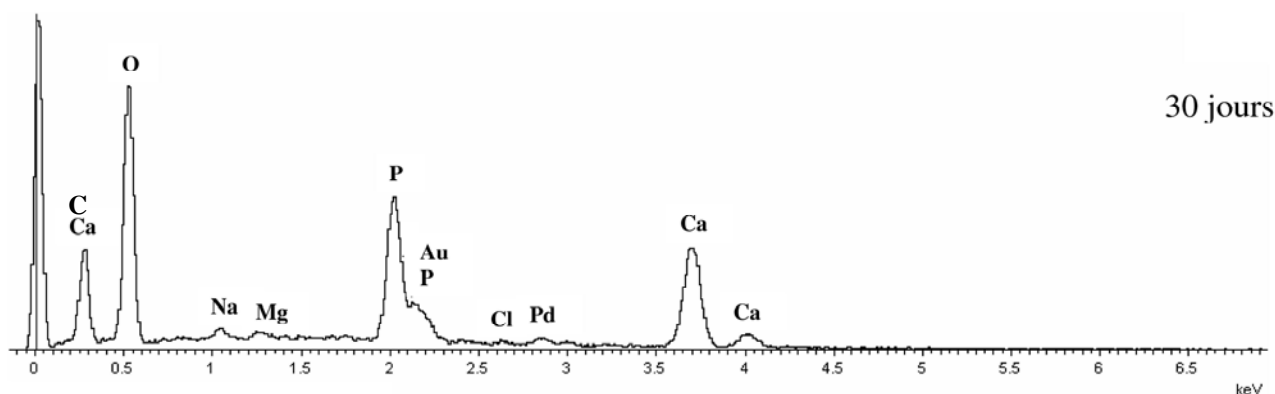


**Figure 6.6.** Surface du verre 46S6 ( $\times 10\,000$ ) après différents délais d'immersion dans le SBF





**Figure 6.7.** Spectre EDS de la surface du 46S6 après 15 jours d'immersion

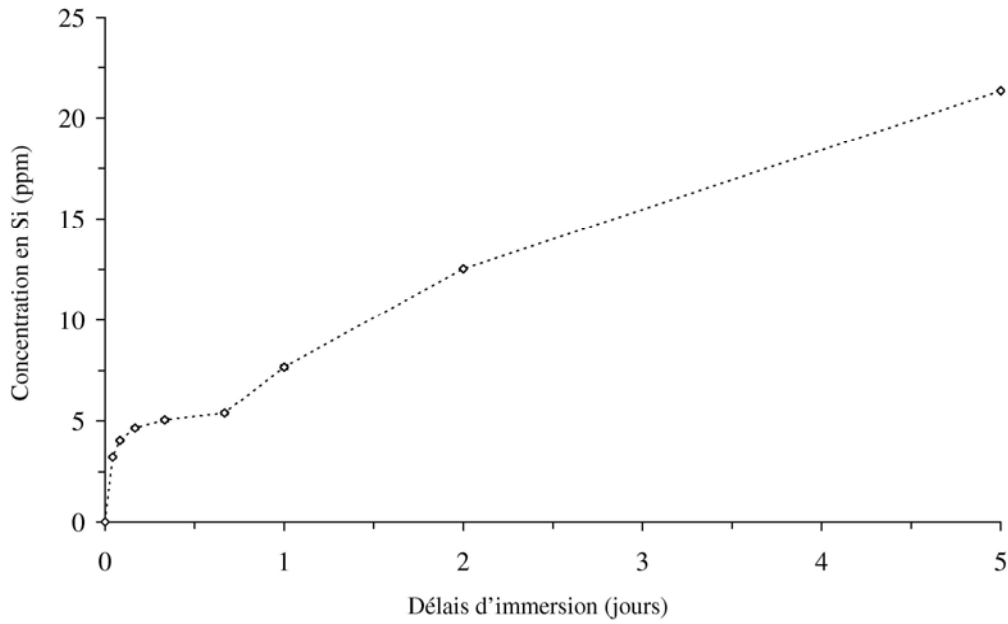


**Figure 6.8.** Spectre EDS de la surface du 46S6 après 30 jours d'immersion

## 2. Evolution de la composition du SBF lors des tests *in vitro*

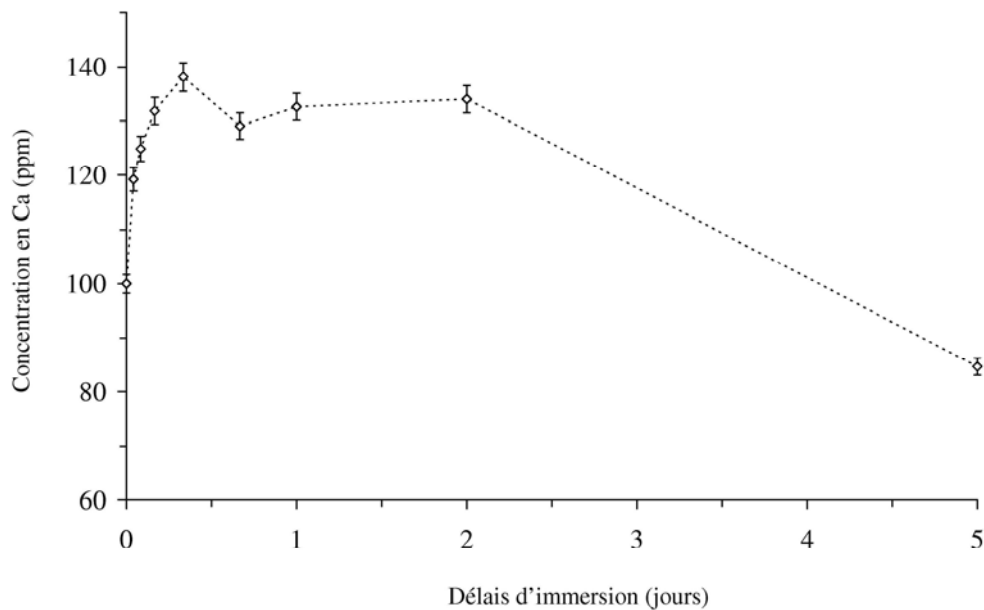
Les figures 6.9 à 6.11 présentent les variations respectives des concentrations en silicium, calcium et phosphore, mesurées par ICP-OES dans le SBF, en fonction des temps d'immersion (jusqu'à 5 jours) lors des tests *in vitro*. Les délais de 15 et 30 jours ne sont pas représentés à cause des phénomènes de saturation observés dans les solutions pour ces temps d'immersion.

La concentration en silicium peut être utilisée comme mesure de la solubilité apparente du verre. En effet, le SBF ne contient pas de silicium et donc les concentrations mesurées proviennent du relargage du verre en silicium dans le SBF au cours des tests *in vitro*. Ainsi, sur la figure 6.9, la concentration en silicium augmente graduellement avec le temps d'immersion, jusqu'à atteindre environ 10 ppm.



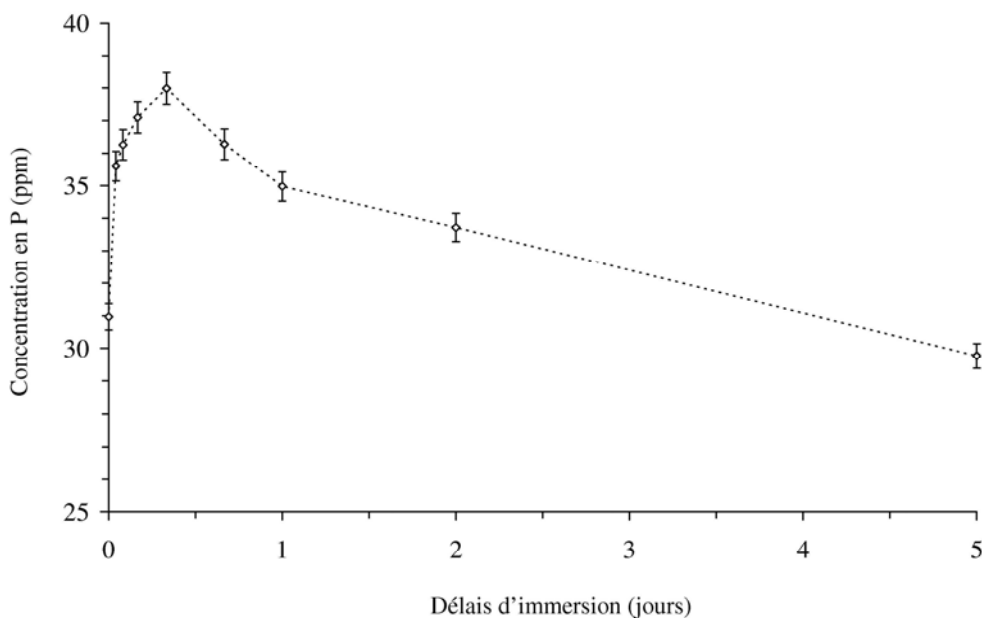
**Figure 6.9.** Concentration en Si dans le SBF en fonction du temps d'immersion

La concentration en calcium dans le SBF analysé augmente pendant les premières heures d'immersion ; le maximum en concentration est atteint après 8 heures d'immersion (figure 6.10). Cette augmentation est suivie par une stabilisation (de 8 à 48h), puis une diminution de la concentration en calcium dans la solution.



**Figure 6.10.** Concentration en Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion

De la même manière, sur la figure 6.11, la concentration en phosphore augmente pendant les premiers délais, puis diminue immédiatement après 8 heures d'immersion.



**Figure 6.11.** Concentration en P dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Le calcium et le phosphore prélevés du SBF sont utilisés pour la formation en surface des verres de la couche de phosphate de calcium. Sur les figures 6.10 et 6.11, les concentrations en calcium et phosphore après 5 jours d'immersion sont légèrement inférieures aux concentrations initiales dans le SBF.

### 3. Résumé des observations pour le verre pur 46S6

L'immersion du 46S6 dans le SBF provoque la dissolution de la matrice vitreuse : du silicium, du calcium et du phosphore sont relargués durant les premières heures. Cette dissolution se poursuit parallèlement avec la formation d'une couche riche en silicium à la surface du verre. Par la suite une autre couche riche en calcium et phosphore commence à se développer et devient prédominante à partir de 5 jours d'immersion. A mesure que le temps d'immersion augmente, cette couche de phosphate de calcium cristallise en hydroxyapatite carbonatée.

## Chapitre 7

### Etude de la bioactivité du verre 46S6 dopé au magnésium

Différentes compositions de verres dopés au magnésium, de 0,4 à 1,2 % (% massique) de magnésium introduit, ont été étudiées afin de mieux comprendre l'influence de cet élément sur la réactivité des verres après immersion.

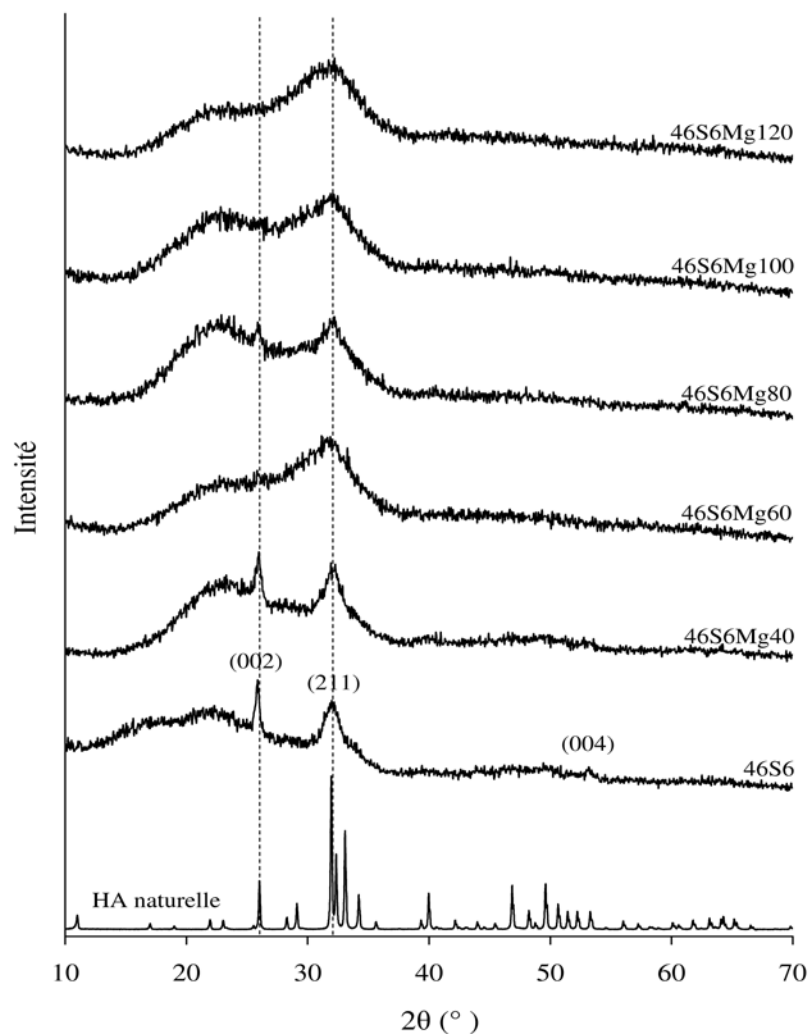
Une étude similaire à celle du 46S6, présentée dans le Chapitre 6, a été réalisée sur les verres dopés au magnésium, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus.

#### 1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre 46S6 dopé au magnésium après immersion dans le SBF

##### 1.1. Analyse des surfaces par DRX

La figure 7.1 présente les diagrammes de diffraction de la surface du 46S6 et des verres dopés au magnésium 46S6MgX ( $40 \leq X \leq 120$ , avec  $X$  le pourcentage en magnésium introduit  $\times 100$ ) après 30 jours d'immersion dans le SBF. Le diffractogramme de l'hydroxyapatite naturelle sert de référence [99].

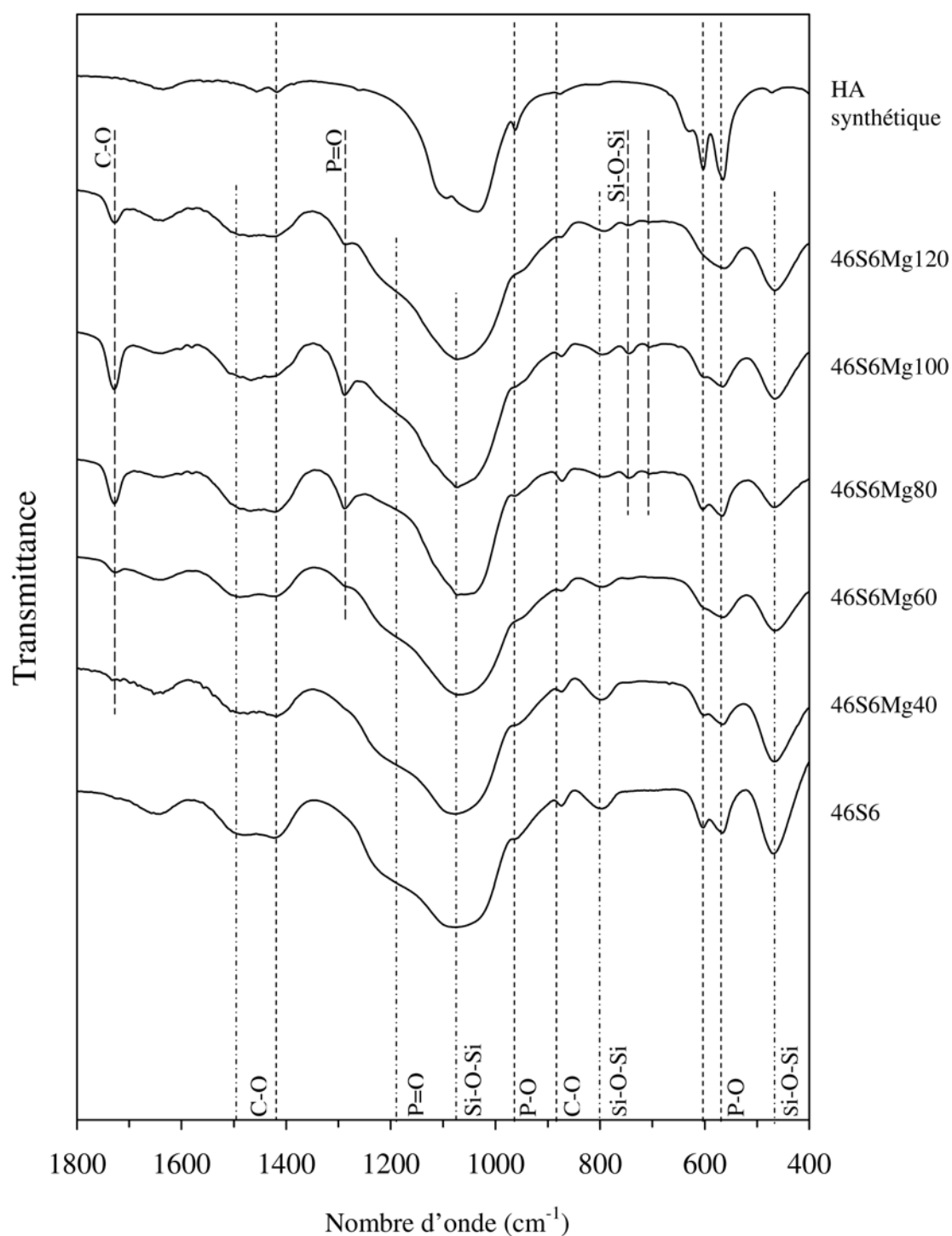
On retrouve sur le diffractogramme du 46S6Mg40 les principaux pics de diffraction de l'hydroxyapatite observés pour le 46S6 à  $26^\circ$  et  $32^\circ$  ( $2\theta$ ), ainsi que l'orientation préférentielle des cristaux selon le plan (002). En effet, de la même manière que pour le 46S6, la raie de diffraction est plus intense à  $26^\circ$  qu'à  $32^\circ$  ( $2\theta$ ). Cependant, avec l'augmentation de la teneur en magnésium, on constate l'élargissement du groupe de raies autour de  $32^\circ$  ( $2\theta$ ), ainsi que la diminution en intensité de la raie (002) à  $26^\circ$  ( $2\theta$ ). Cette dernière a d'ailleurs complètement disparu pour les compositions 46S6Mg100 et 46S6Mg120.



**Figure 7.1.** DRX de la surface des verres dopés au magnésium après 30 jours d'immersion dans le SBF et de l'hydroxyapatite naturelle [98]

## 1.2. Analyse de la couche formée en surface par FTIR

Les spectres IR de la couche recueillie en surface du 46S6 et des verres dopés en magnésium après 30 jours d'immersion sont présentés sur la figure 7.2. Les spectres du 46S6, notre référence, et les spectres des verres dopés au magnésium présentent de nombreuses bandes communes. On retrouve ainsi sur l'ensemble des spectres les bandes caractéristiques de l'hydroxyapatite formée en surface : les trois bandes P-O à 565, 603 et 961  $\text{cm}^{-1}$  et les trois bandes C-O à 873, 1420 et 1470  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes caractéristiques de la couche sous-jacente de  $\text{SiO}_2$  sont également présentes à 470 et 1075  $\text{cm}^{-1}$ . Cependant, on observe la disparition de la bande P-O à 603  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique des phosphates en phase cristalline, avec l'augmentation de la teneur en magnésium.

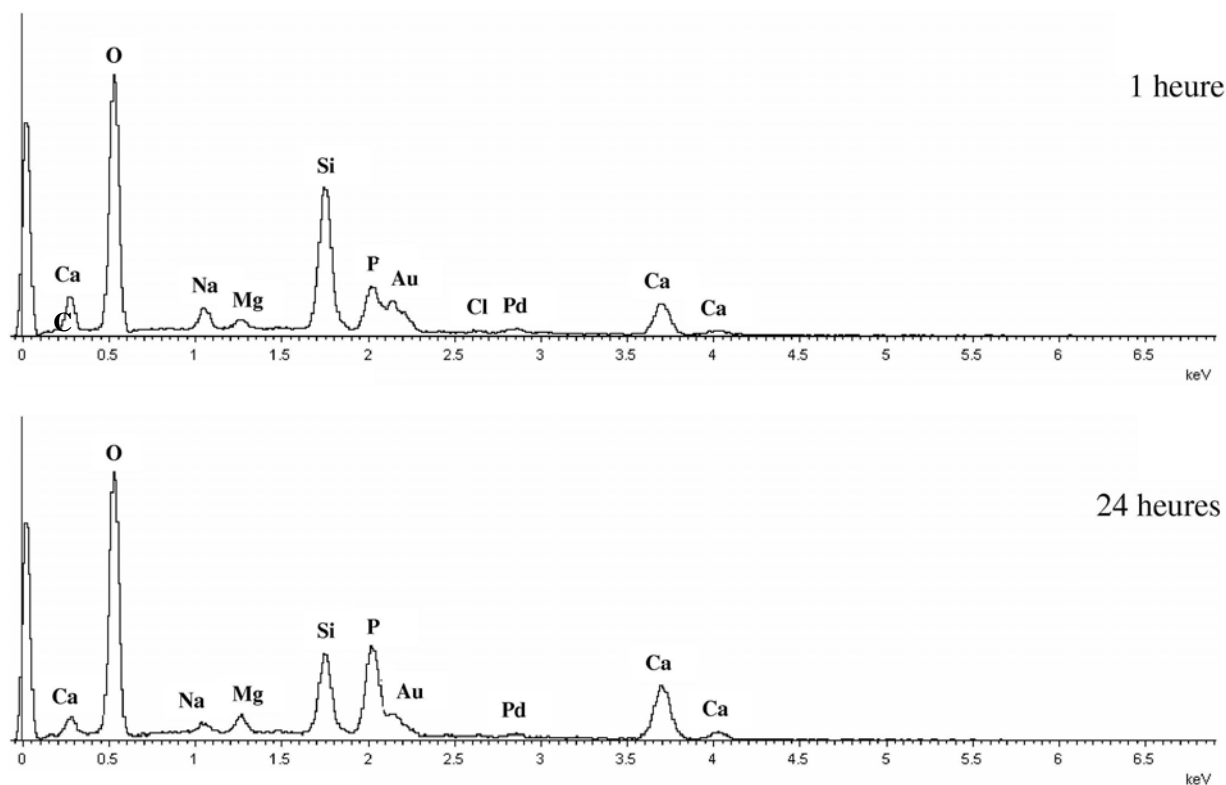


**Figure 7.2.** Spectres IR de la surface des verres dopés au magnésium après 30 jours d'immersion dans le SBF

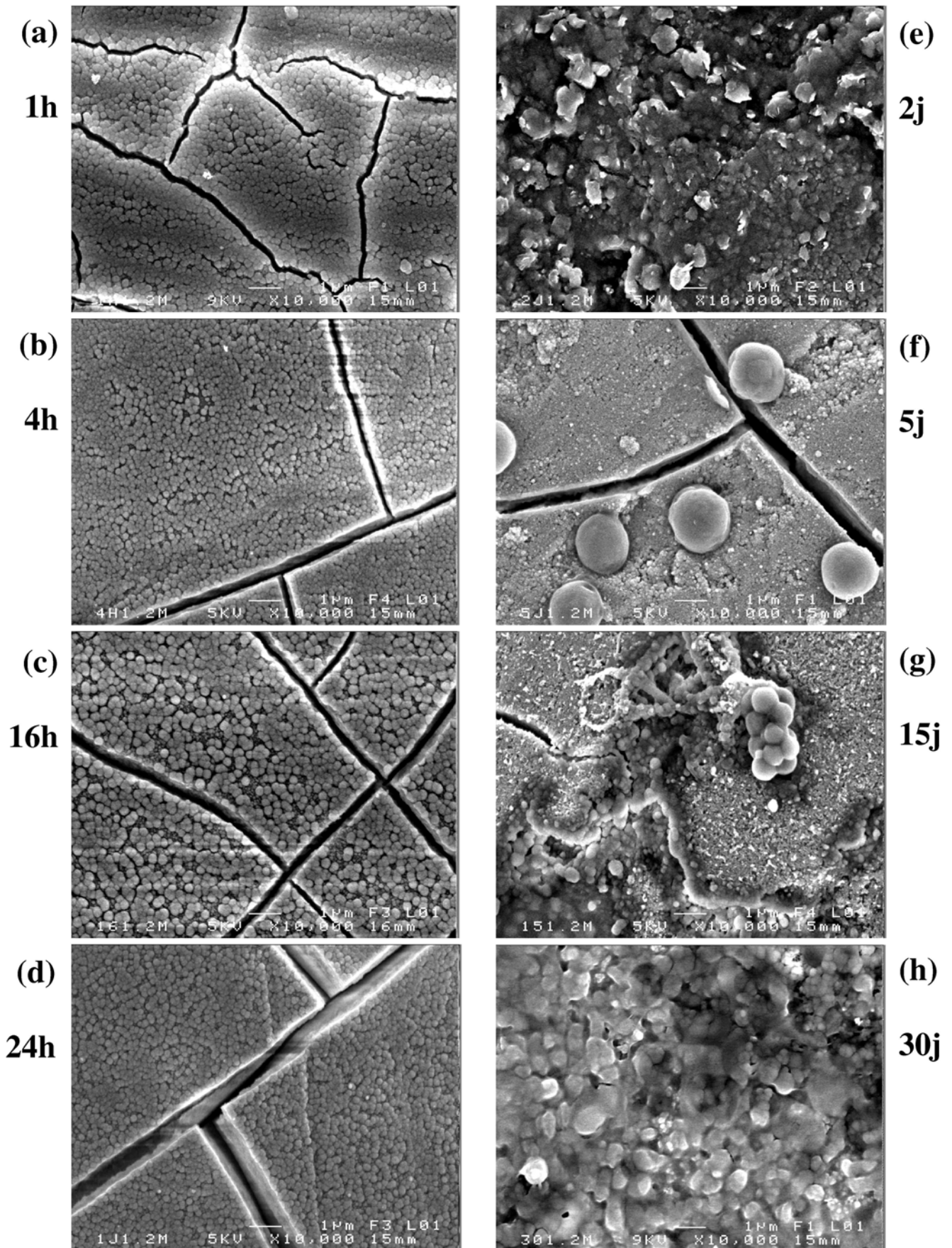
La bande C-O à  $1725 \text{ cm}^{-1}$ , déjà observée dans le chapitre précédent, augmente en intensité. Enfin, trois nouvelles bandes apparaissent à 705, 745, 1287  $\text{cm}^{-1}$ . Elles peuvent être assignées respectivement aux liaisons Si-O-Si pour les deux premières et P=O pour la dernière.

### 1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion

Les micrographies de la surface du verre 46S6Mg120 après différents délais d'immersion sont représentées sur la figure 7.4. Chaque micrographie a été faite au grossissement ( $\times 10\,000$ ) et réalisée après un délai d'immersion différent, compris entre 1 heure et 30 jours. Les analyses par EDS associées à chaque délai d'immersion sont exposées dans les figures 7.3, 7.5 et 7.6. Entre 1 heure et 1 jour d'immersion, la surface du 46S6Mg120 présente une couche similaire à celle du 46S6 (voir Chapitre 6, figure 6.6), constituée de particules sphériques compactées entre elles. On remarque également la présence des craquelures, mais à délai équivalent ces dernières sont plus régulières et plus larges que celles observées en surface du 46S6. Comparativement au spectre EDS obtenu pour le verre 46S6Mg120 (figure 4.5.), on constate après une heure d'immersion une diminution des quantités de sodium et de calcium présents en surface (figure 7.3). Le silicium est l'élément présent majoritairement à la surface de notre verre après 1 heure d'immersion. Cependant, à partir de 1 jour d'immersion, la quantité de silicium présent en surface décroît au profit de la quantité de calcium et de phosphore (figure 7.3). La couche phosphocalcique commence à croître en surface dès 1 jour d'immersion pour le 46S6Mg120, alors que ce phénomène n'a été observé qu'à partir de 5 jours pour le 46S6 (figure 6.5).

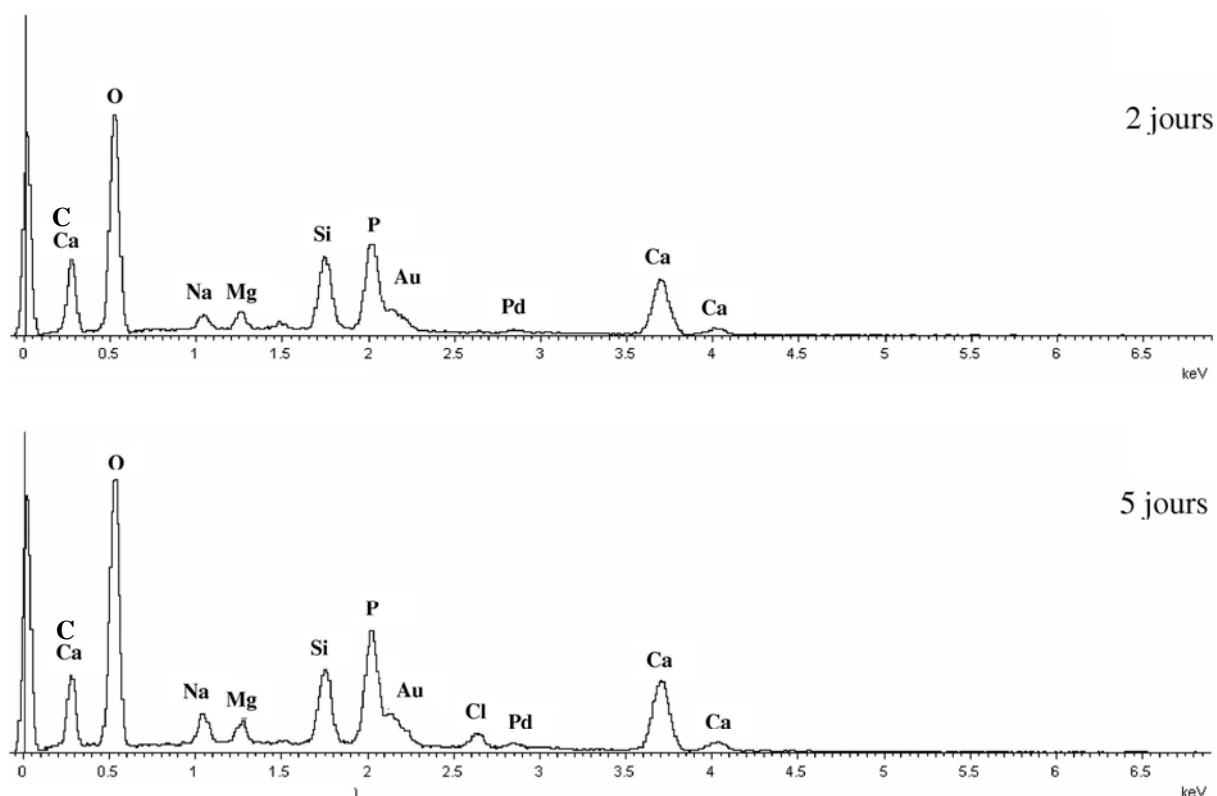


**Figure 7.3.** Spectres EDS de la surface du 46S6Mg120 après 1 et 24 heures d'immersion



**Figure 7.4.** Surface du verre 46S6Mg120 ( $\times 10\,000$ ) après différents délais d'immersion

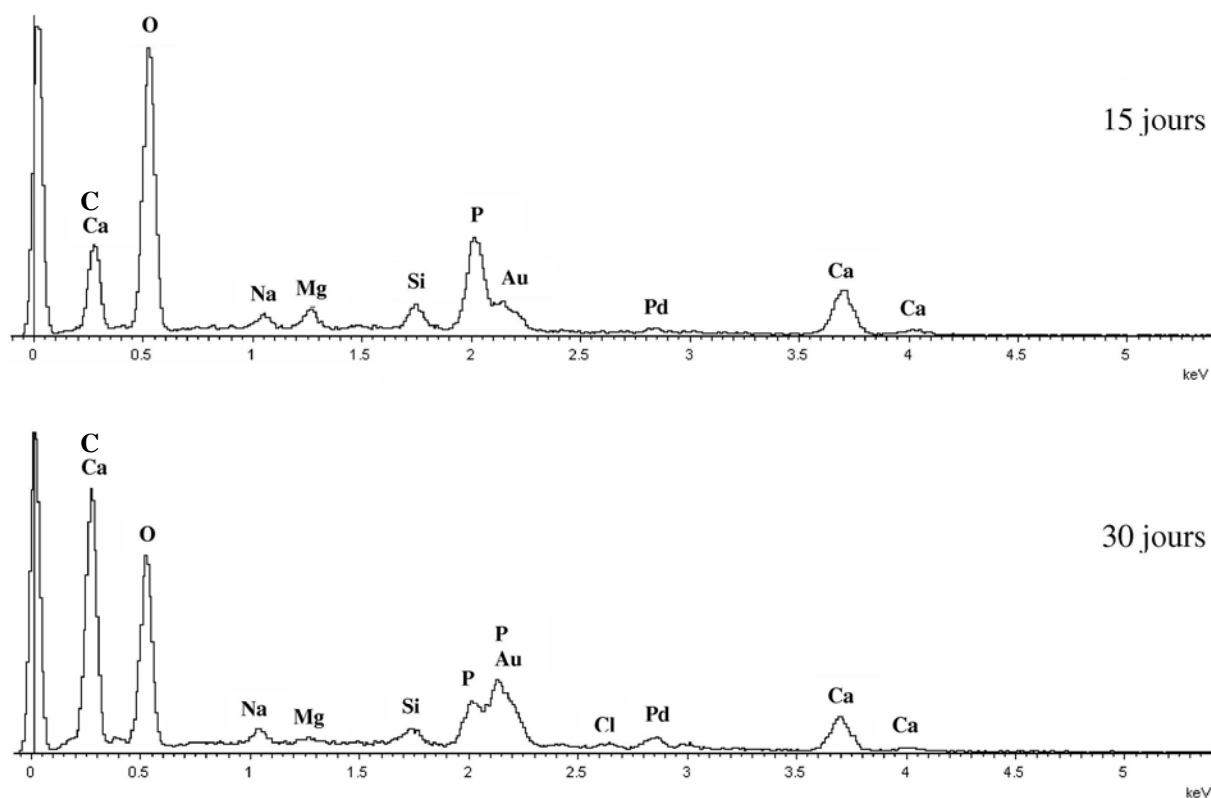




**Figure 7.5.** Spectres EDS de la surface du 46S6Mg120 après 2 et 5 jours d’immersion

Après 2 jours d’immersion, le verre 46S6Mg120 présente une surface irrégulière (figure 7.4-e), qui n’est observée qu’après 5 jours d’immersion pour le 46S6. Après 15 jours d’immersion, la surface du 46S6 est recouverte de cristaux (figure 6.6-g), alors qu’aucune phase cristalline n’est observée à la surface du 46S6Mg120 après 15 et 30 jours d’immersion (figure 7.4–g,h). L’analyse EDS de la surface du 46S6Mg120 après 2 et 5 jours d’immersion (figure 7.5) confirme la croissance d’une couche de phosphate de calcium amorphe (étape 4 du processus de bioactivité), ainsi que la présence de la sous-couche riche en  $\text{SiO}_2$ . Cependant après 15 et 30 jours d’immersion, cette dernière n’est quasiment plus détectée (figure 7.6) ; en effet, la couche de phosphate de calcium a continué à se développer en surface. Son épaisseur est devenue trop importante pour pouvoir atteindre, lors de l’analyse, la couche de  $\text{SiO}_2$ .

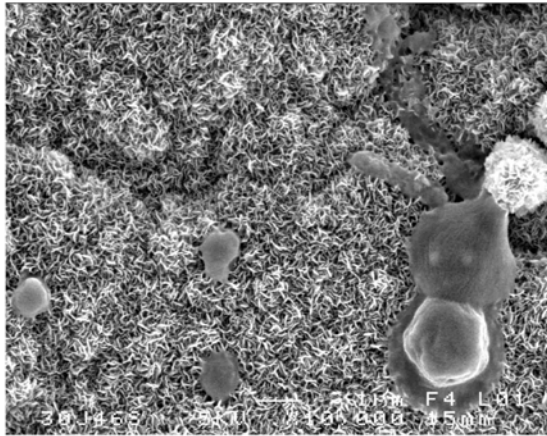
De plus, le magnésium est présent sur l’ensemble des spectres. L’hydroxyapatite formée à la surface de nos verres n’est donc pas pure ; elle contient du magnésium, ainsi que des carbonates (d’après l’analyse IR). Dans le cas des verres dopés au Mg, une partie de magnésium incorporée dans les couches formées lors des tests *in vitro* provient du SBF et l’autre partie est issue des éléments relargués par la matrice vitreuse lors de sa dissolution.



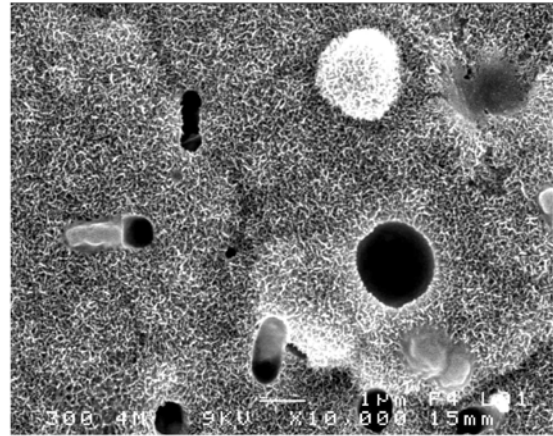
**Figure 7.6.** Spectres EDS de la surface du 46S6Mg120 après 15 et 30 jours d'immersion

La figure 7.7 présente les micrographies (grossissement  $\times 10\,000$ ) après 30 jours d'immersion de la surface des différents verres dopés au magnésium. La morphologie de la couche d'hydroxyapatite évolue en fonction de la teneur en magnésium introduite.

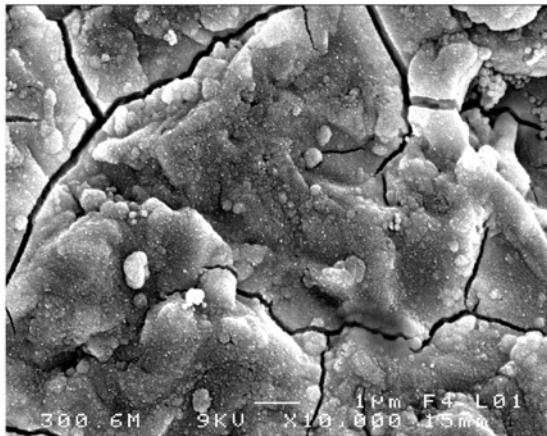
Pour le 46S6, le 46S6Mg40 et 46S6Mg80, des cristaux sont observés en surface. Cependant, la taille et le relief de ces cristaux diminue avec l'augmentation de la teneur en magnésium. Aucune phase cristalline n'est observée pour les autres compositions. L'analyse par EDS de la surface du 46S6Mg120 après 30 jours d'immersion confirme la forte présence de calcium et de phosphore. Ainsi les compositions 46S6Mg60, 46S6Mg100 et 46S6Mg120 présentent bien en surface une couche de phosphate de calcium, mais cette dernière demeure amorphe.



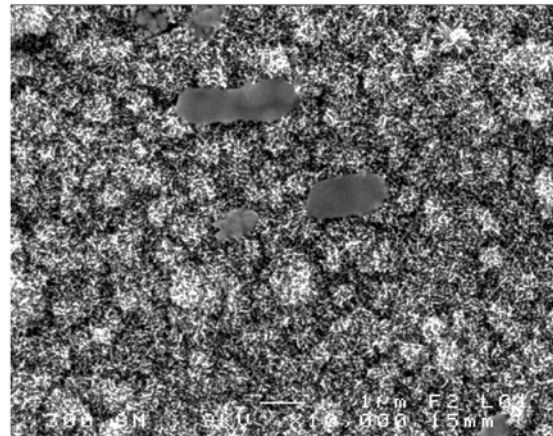
1. 46S6



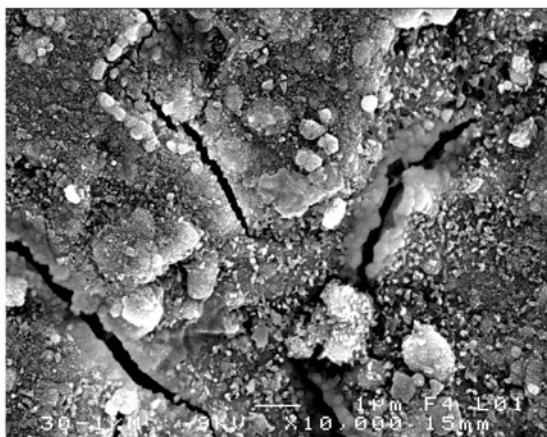
2. 46S6Mg40



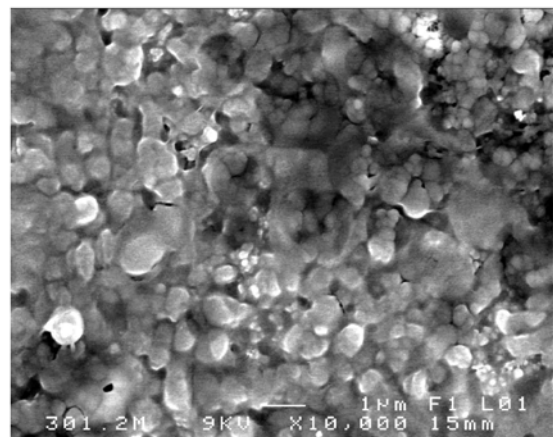
3. 46S6Mg60



4. 46S6Mg80



5. 46S6Mg100

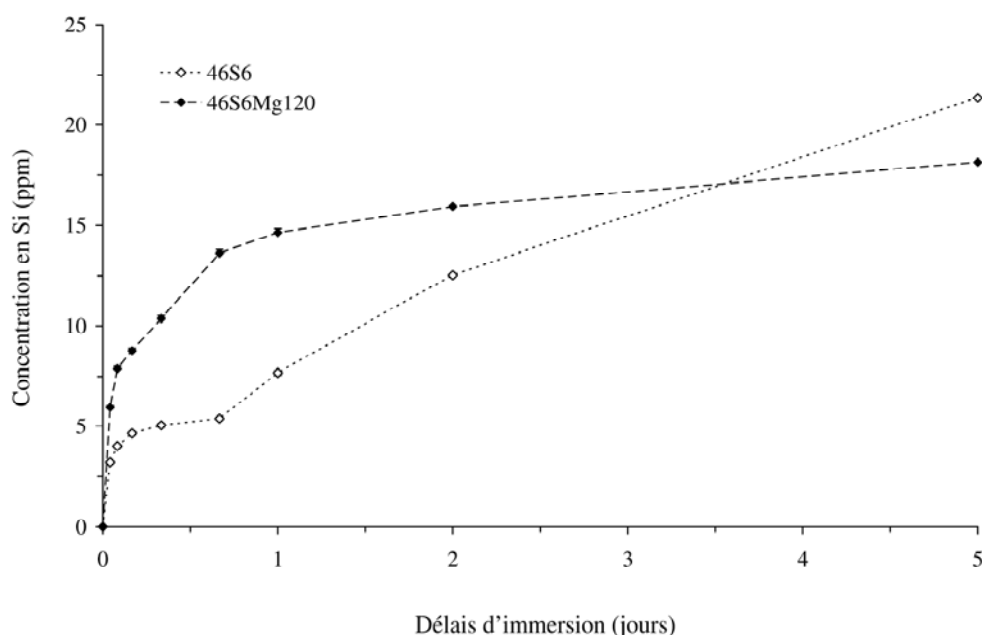


6. 46S6Mg120

**Figure 7.7.** Surface des verres pour différentes teneurs en magnésium ( $\times 10\,000$ ) après 30 jours d'immersion dans le SBF.

## 2. Effet du magnésium sur la composition du SBF lors des tests *in vitro*

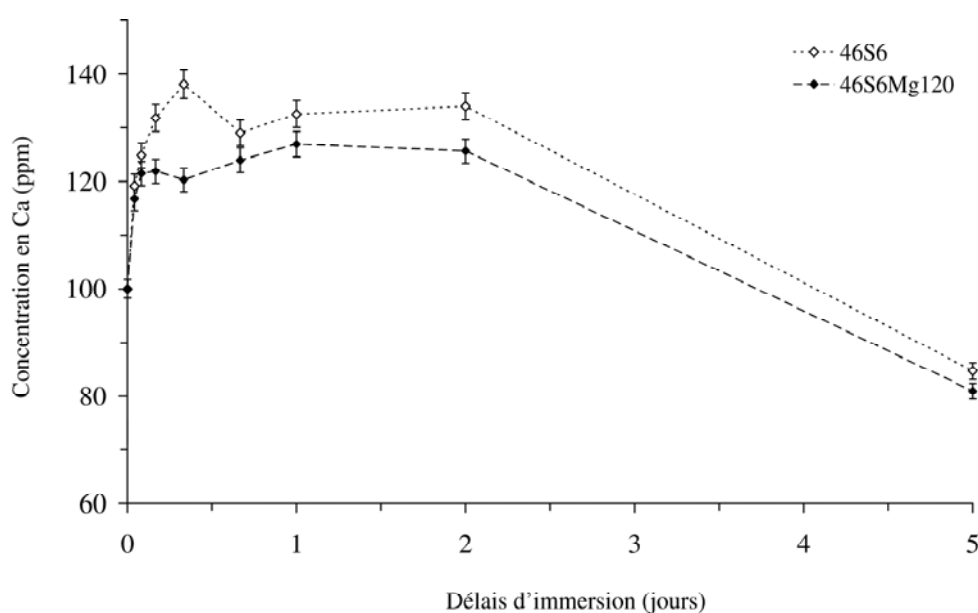
L'évolution de la composition du SBF en fonction du temps d'immersion des échantillons de 46S6 et de 46S6Mg120 est présentée sur les figures 7.8, 7.9 et 7.10. Les délais de 15 et 30 jours ne sont pas représentés à cause des phénomènes de saturation observés dans les solutions pour ces temps d'immersion. Les variations de concentration en magnésium observées ne sont pas assez significatives pour être présentées.



**Figure 7.8.** Concentration en Si dans le SBF en fonction du temps d'immersion

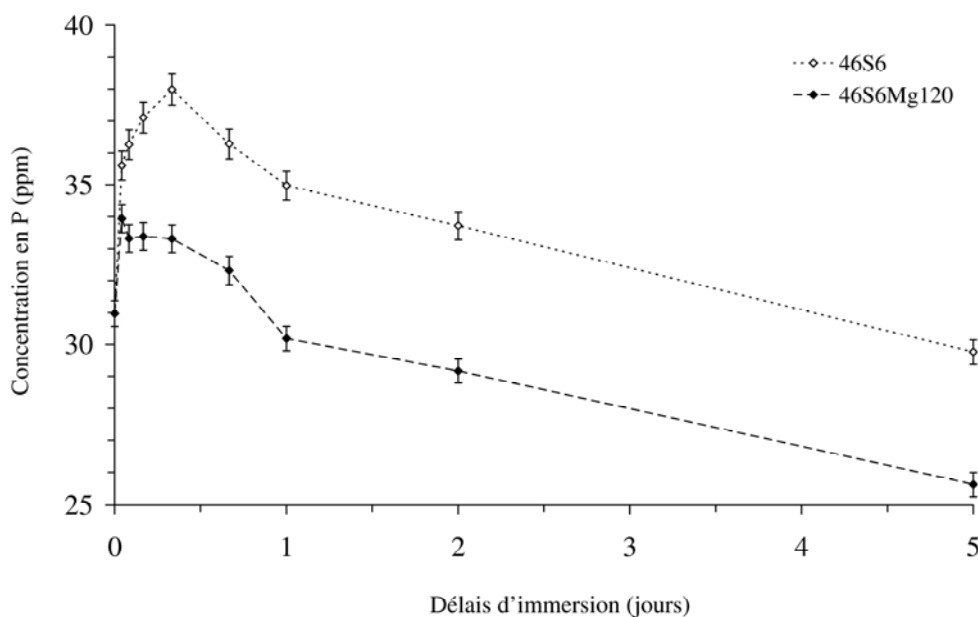
Sur la figure 7.8 sont présentées les évolutions des concentrations en silicium pour les deux compositions étudiées (les barres d'erreur sont trop faibles pour être visibles). Au temps zéro, la quantité de silicium dans le SBF est nulle, mais dès les premières heures d'immersion le silicium est relargué et il est donc détecté dans de faibles quantités. Puis, avec la dissolution du réseau vitreux, la quantité de silicium dans le SBF augmente ; elle commence à se stabiliser à partir de 2 jours d'immersion et atteint sa valeur limite à 5 jours d'immersion. Cependant, la concentration en silicium relargué est en moyenne deux fois plus importantes pour le verre dopé au magnésium 46S6Mg120 que pour le verre pur, jusqu'à 1 jour d'immersion. Au-delà, cette différence de concentration tend à diminuer et s'inverse entre 3 et 4 jours. Ainsi, à 5 jours, la valeur limite de silicium atteinte dans le SBF est environ de 21 ppm pour le 46S6 et de 18 ppm pour le 46S6Mg120.

L'évolution de la concentration en calcium (figure 7.9) dans le SBF présente de fortes variations dès les premières heures d'immersion. Pour le 46S6, on observe une augmentation de la concentration en calcium jusqu'à 8 heures d'immersion, alors que pour le 46S6Mg120 la concentration en calcium continue d'augmenter jusqu'à 24 heures d'immersion. Le relargage du calcium hors de la matrice vitreuse est supérieur pour le verre pur 46S6. Cette étape de relargage est suivie d'une diminution de la concentration en calcium dans le SBF. Celui-ci est alors prélevé du SBF et utilisé pour la formation à la surface des verres de la couche de phosphate de calcium. A partir de 16 heures, les concentrations en calcium des deux compositions suivent une évolution parallèle.



**Figure 7.9.** Concentration en Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion

La figure 7.10 présente l'évolution de la concentration en phosphore dans le SBF jusqu'à 5 jours d'immersion. Pour le 46S6Mg120, on observe une faible augmentation (quelques ppm) de la concentration en phosphore jusqu'à 1 heure d'immersion, alors que pour le 46S6 la concentration en phosphore continue d'augmenter jusqu'à 8 heures d'immersion mais toujours faiblement (environ 7 ppm au maximum). La concentration en phosphore diminue ensuite rapidement pour atteindre après 5 jours d'immersion environ 30 ppm pour le 46S6 et 26 ppm pour le 46S6Mg120. Le phosphore prélevé du SBF est également utilisé pour la formation à la surface des verres de la couche de phosphate de calcium.



**Figure 7.10.** Concentration en P dans le SBF en fonction du temps d'immersion

De la même manière que pour le calcium, mais cette fois à partir de 8 heures d'immersion, les concentrations en phosphore des deux compositions de verre suivent une évolution parallèle.

### 3. Résumé des observations pour les verres dopés au magnésium

L'introduction de magnésium augmente fortement la dissolution de la matrice vitreuse pendant les premières heures d'immersion, comme en témoignent les concentrations en silicium relargué. A l'inverse, les quantités de calcium et de phosphore relarguées dans le SBF sont plus faibles comparativement au verre pur 46S6.

Néanmoins, la croissance de la couche de phosphate de calcium commence dès le premier jour d'immersion avec une forte utilisation du calcium et du phosphore présents dans le SBF ; cette croissance est confirmée par les analyses EDS. A partir de 5 jours d'immersion, les quantités de calcium et phosphore en surface du verre deviennent prédominantes ; on assiste également à d'importantes modifications morphologiques de la surface du verre. Cependant, après 30 jours d'immersion, aucune cristallisation de la couche de phosphate de calcium n'est observée.



## Chapitre 8

### Etude de la bioactivité du verre 46S6 dopé au zinc

Afin d'établir une comparaison entre le verre pur 46S6, les verres dopés au magnésium et les verres dopés au zinc, une étude similaire à celles présentées aux Chapitres 6 et 7 a été effectuée. Différentes compositions de verres dopés au zinc, de 0,02 à 0,1 % (% massique) de zinc introduit, ont été étudiées afin de mieux comprendre l'influence de cet élément sur la réactivité des verres bioactifs lors des tests *in vitro*.

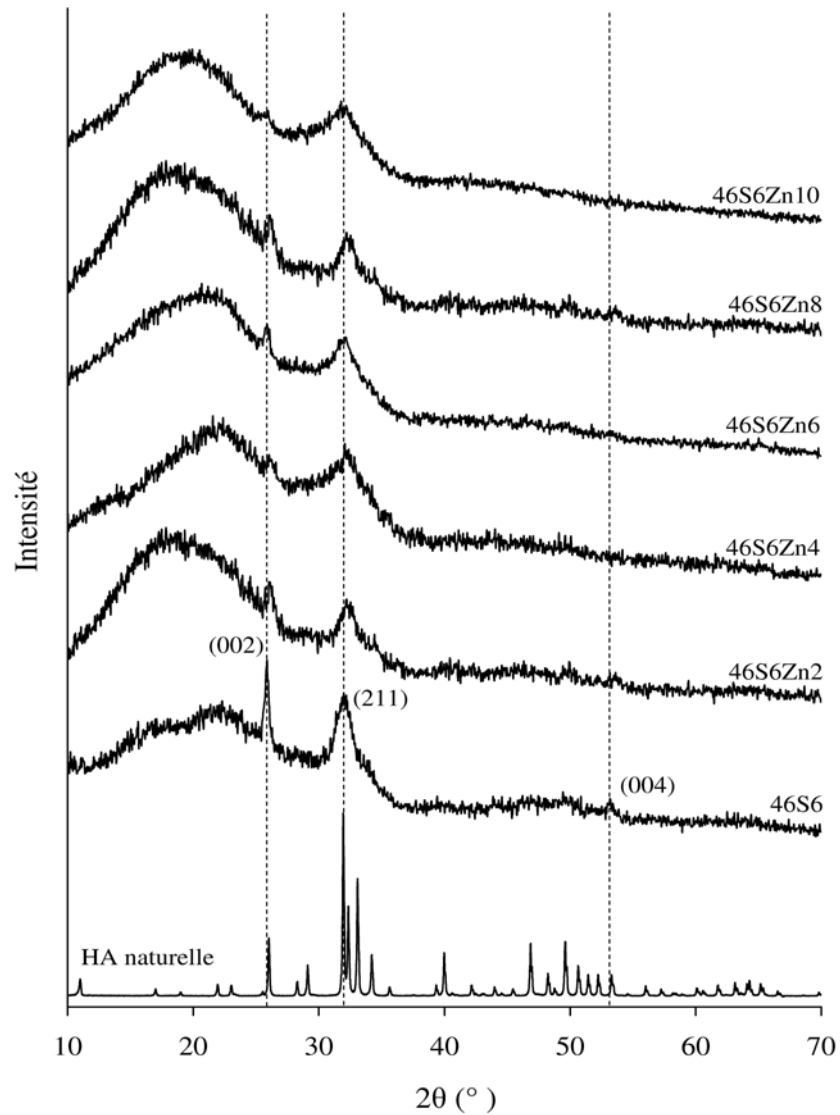
#### 1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre 46S6 dopé au zinc après immersion dans le SBF

##### 1.1. Analyse des surfaces par DRX

La figure 8.1 présente les diagrammes de diffraction de la surface du 46S6 et des verres dopés au zinc 46S6ZnX ( $2 \leq X \leq 10$ , avec  $X$  le pourcentage en zinc introduit  $\times 100$ ) après 30 jours d'immersion dans le SBF. Le diffractogramme de l'hydroxyapatite naturelle sert de référence [99].

La formation d'hydroxyapatite en surface du 46S6 est confirmée grâce à la présence des deux raies de diffraction à  $26^\circ$  ( $2\theta$ ) et  $53^\circ$  ( $2\theta$ ) et du groupe de raies autour de  $32^\circ$  ( $2\theta$ ), qui correspondent respectivement aux réflexions des plans (002) et (004) et au groupe de plans (211), (112) et (300) de l'apatite (voir Chapitre 6). Concernant les verres dopés, on constate que l'introduction de zinc dans la matrice vitreuse provoque des effets comparables à ceux observés lors de l'ajout de magnésium. En effet, l'enveloppe de raies autour de  $32^\circ$  ( $2\theta$ ) s'élargit et la raie (002) à  $26^\circ$  ( $2\theta$ ) diminue en intensité, avec l'augmentation de la teneur en zinc. On constate également la disparition complète de la raie (004) à  $53^\circ$  ( $2\theta$ ) pour le 46S6Zn10.

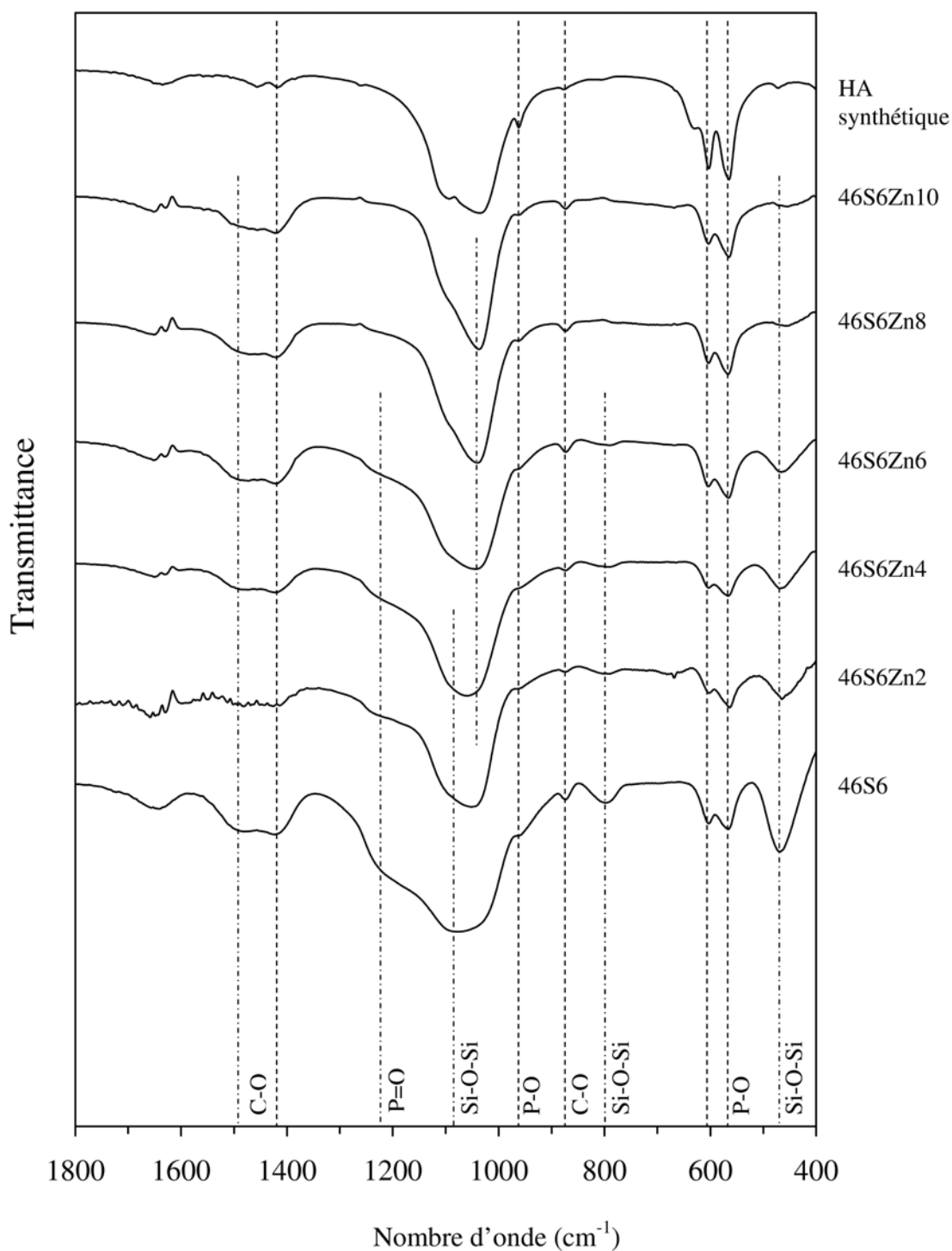




**Figure 8.1.** DRX de la surface des verres dopés au zinc après 30 jours d’immersion dans le SBF et de l’hydroxyapatite naturelle [98]

## 1.2. Analyse de la couche formée en surface par FTIR

Les spectres IR de la couche recueillie en surface du 46S6 et des verres dopés au zinc après 30 jours d’immersion sont présentés sur la figure 8.2. Pour l’ensemble des compositions, la précipitation et la cristallisation d’une couche de phosphate de calcium sont confirmées par la présence des bandes P-O à 565, 603 et 961  $\text{cm}^{-1}$ . De plus, les bandes C-O à 873, 1420 et 1470  $\text{cm}^{-1}$  indiquent qu’il s’agit d’une hydroxyapatite carbonatée [87]. Cependant, plusieurs variations en intensité et en position des bandes sont observées avec l’augmentation de la teneur en zinc sur les spectres IR après 30 jours d’immersion.



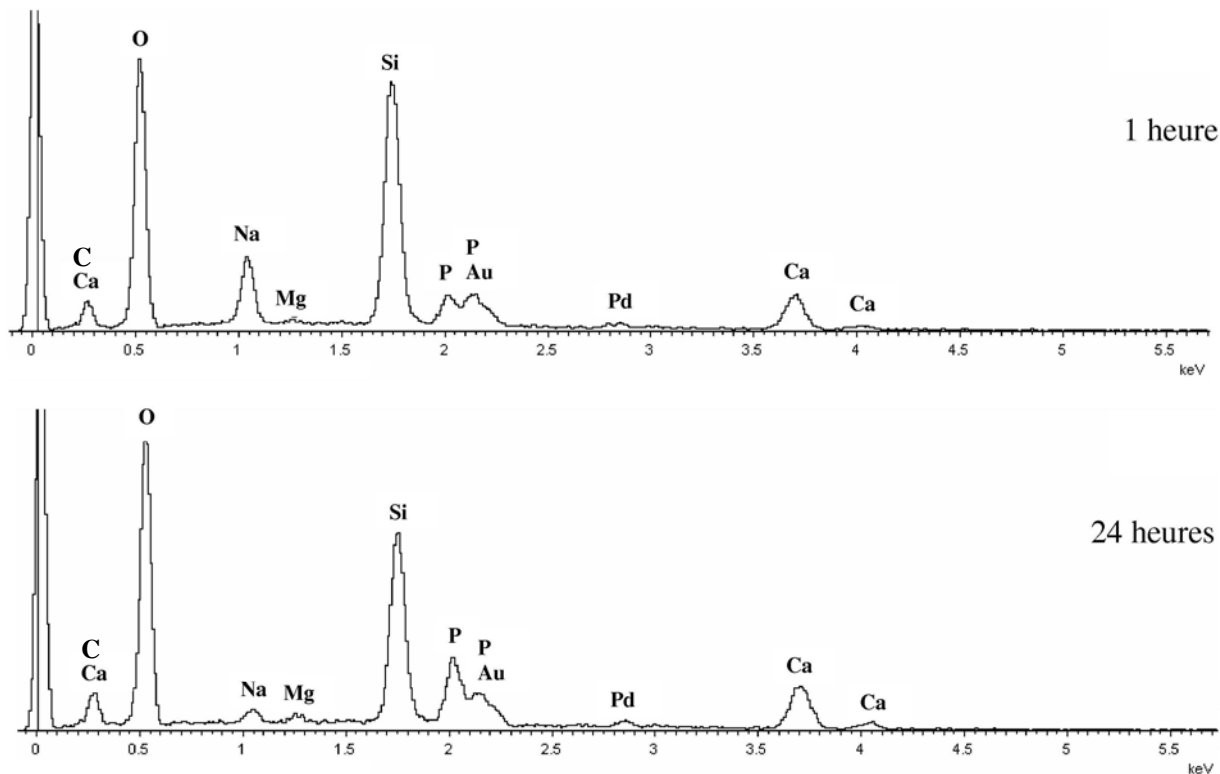
**Figure 8.2.** Spectres IR de la surface des verres dopés au zinc après 30 jours d'immersion

Ainsi, la bande Si-O-Si à  $470\text{ cm}^{-1}$  diminue fortement en intensité ; la bande Si-O-Si à  $795\text{ cm}^{-1}$  et l'épaule P=O à  $1220\text{ cm}^{-1}$  diminuent également en intensité, jusqu'à disparaître pour le 46S6Zn8 et le 46S6Zn10 ; enfin, la bande Si-O-Si à  $1080\text{ cm}^{-1}$  est déplacée à  $1040\text{ cm}^{-1}$  (figure 8.2).

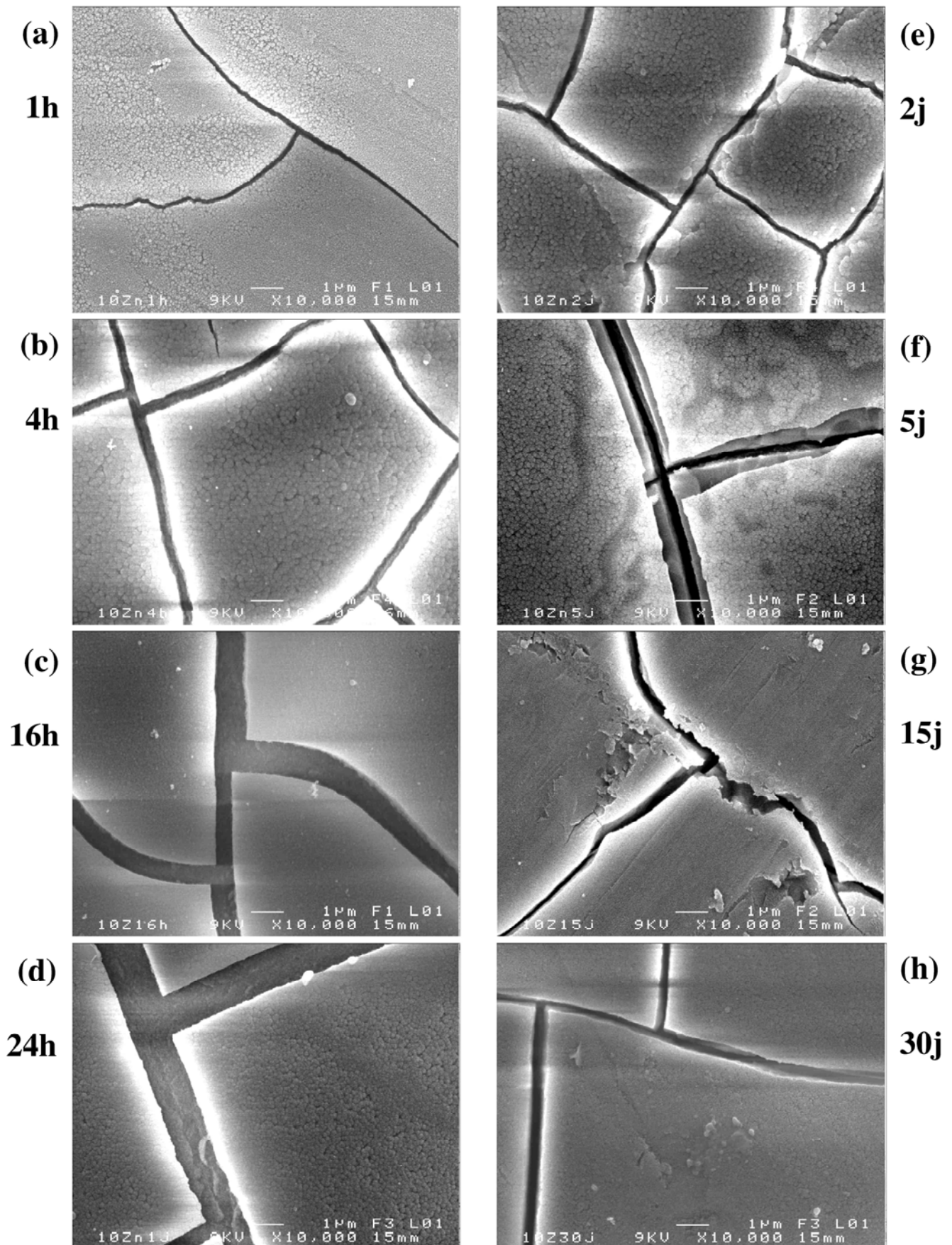
### 1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion

Les micrographies de la surface du verre 46S6Zn10 après différents délais d'immersion sont représentées sur la figure 8.4. Chaque micrographie a été faite au grossissement ( $\times 10\,000$ ) et réalisée après un délai d'immersion différent, compris entre 1 heure et 30 jours. Les analyses EDS associées à chaque délai d'immersion sont exposées dans les figures 8.3, 8.5 et 8.6.

Entre 1 heure et deux jours d'immersion, la surface du 46S6Zn10 présente une morphologie très proche de celle du 46S6 à délai d'immersion équivalent : la surface est craquelée et composée de petites particules sphériques compactées entre elles. L'analyse par EDS confirme le développement d'une couche riche en silicium. Cependant, dès 1 jour d'immersion (figure 8.3), des quantités non négligeables de calcium et de phosphore sont détectées à la surface du 46S6Zn10, ce qui n'a pas été observé à la surface du 46S6 (figure 6.4). Cette tendance est confirmée à 2 jours d'immersion (figure 8.5) avec une diminution de la quantité de silicium présente en surface.

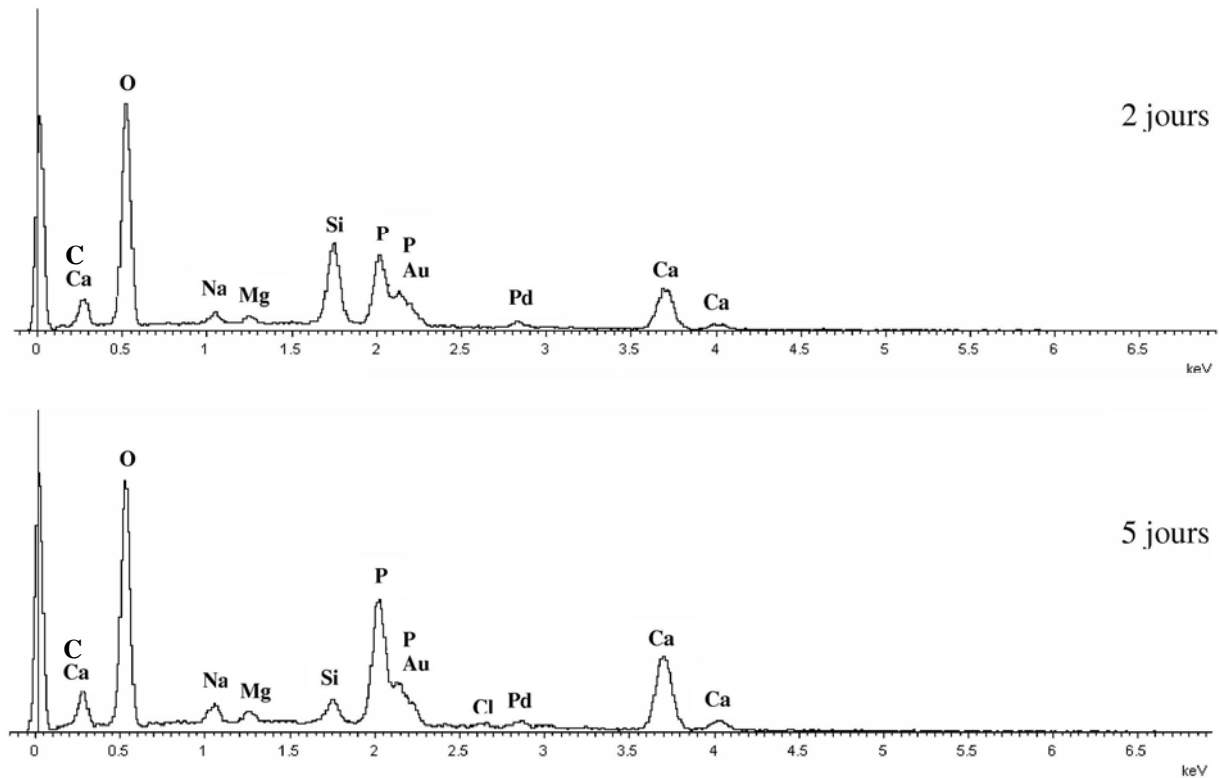


**Figure 8.3.** Spectres EDS de la surface du 46S6Zn10 après 1 et 24 heures d'immersion



**Figure 8.4.** Surface du verre 46S6Zn10 ( $\times 10\,000$ ) après différents délais d'immersion

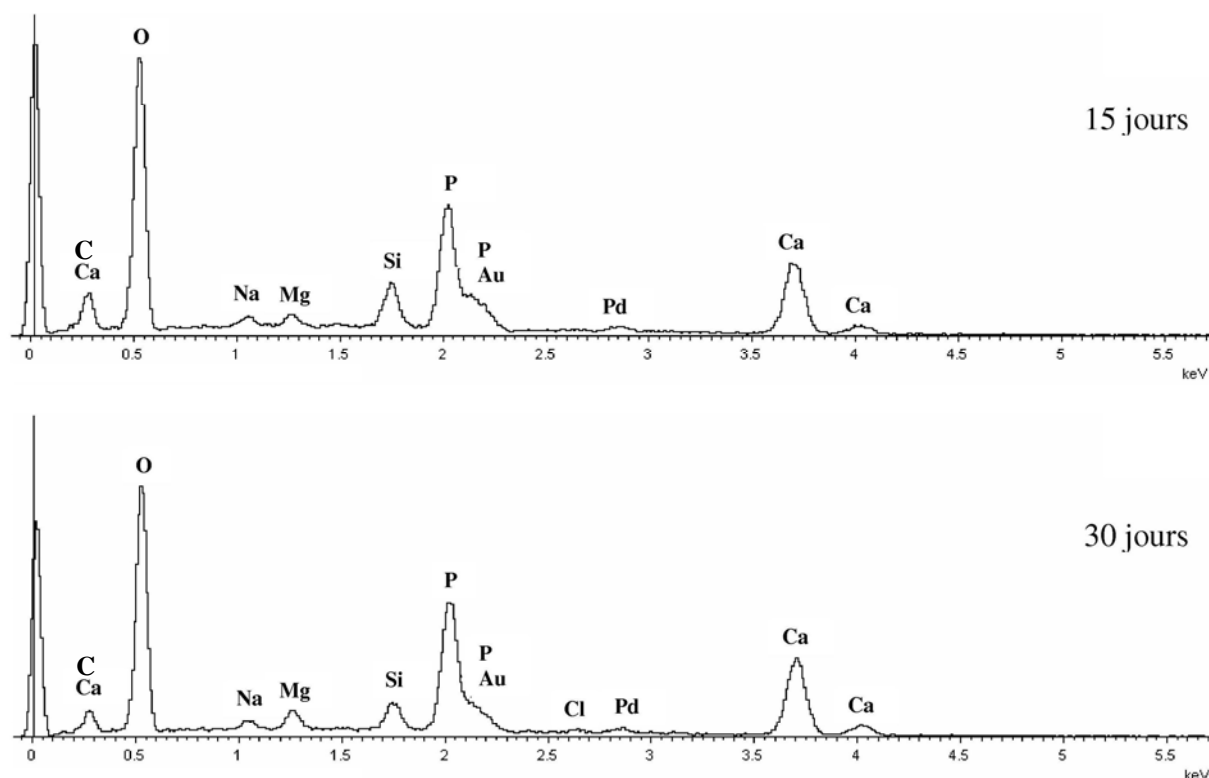
La formation de la couche de phosphate de calcium commence dès 1 jour d'immersion dans le SBF à la surface du 46S6Zn10. La croissance de cette couche se poursuit à 5, 15 et 30 jours d'immersion, comme l'indiquent les spectres EDS des figures 8.5 et 8.6.



**Figure 8.5.** Spectres EDS de la surface du 46S6Zn10 après 2 et 5 jours d'immersion

Cependant, contrairement au verre pur 46S6, aucune phase cristalline n'est observée après 15 jours d'immersion (figure 8.4–g). Une très légère cristallisation semble néanmoins apparaître à la surface du 46S6Zn10 après 30 jours d'immersion (figure 8.4–h), dont la présence est confirmée par la diffraction des rayons X à ce même délai.

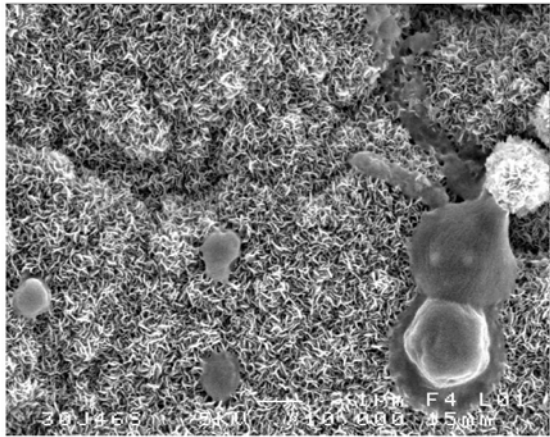
Enfin, pour les différents délais étudiés, la présence de magnésium en surface des verres est détectée. Ce magnésium, de la même manière que pour le 46S6, provient du SBF dans lequel ont été immergés les échantillons.



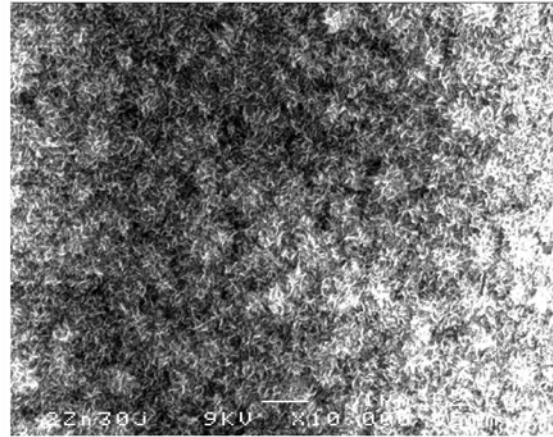
**Figure 8.6.** Spectres EDS de la surface du 46S6Zn10 après 15 et 30 jours d'immersion

Cet effet du zinc sur la taille des cristaux de l'hydroxyapatite est confirmé par l'étude de la surface des verres dopés avec différents teneurs en zinc. La figure 8.7 présente les micrographies (grossissement  $\times 10\,000$ ) après 30 jours d'immersion de la surface des différents verres dopés avec des teneurs comprises entre 0,02 et 0,1% (% massique) de zinc.

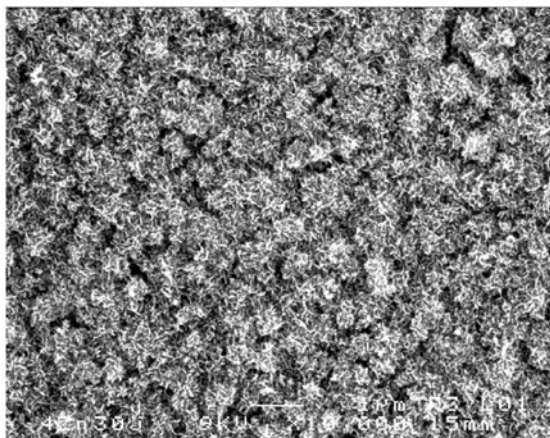
La couche d'hydroxyapatite observée à la surface des verres 46S6, 46S6Zn2 et 46S6Zn4 présente une morphologie comparable : elle est constituée de petits cristaux de forme identique, mais la taille de ces derniers diminue avec l'augmentation de la teneur en zinc. Cette tendance est confirmée à l'observation des micrographies du 46S6Zn6, 46S6Zn8 et 46S6Zn10 : pour ces trois compositions, la taille des cristaux a fortement diminuée et ces derniers ne sont quasiment plus observables pour le 46S6Zn10.



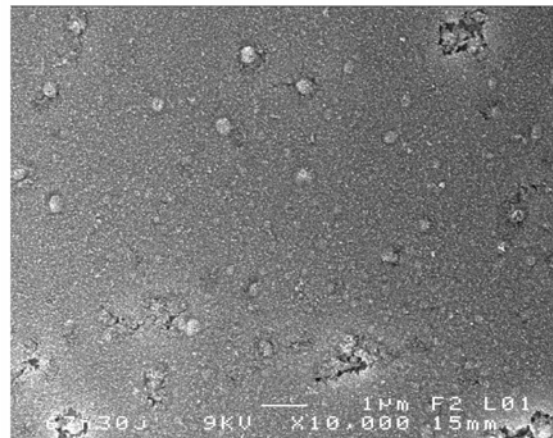
1. 46S6



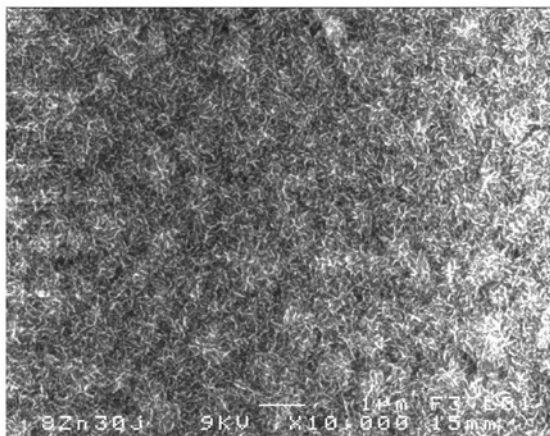
2. 46S6Zn2



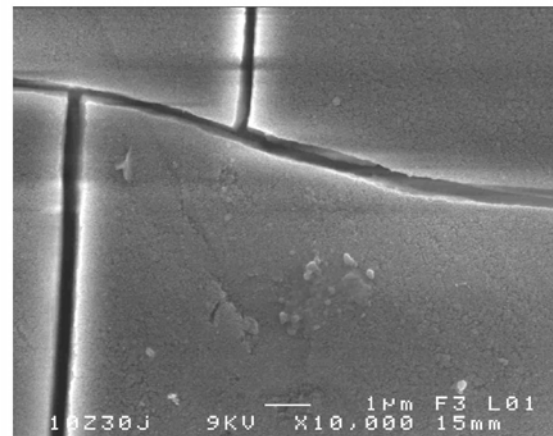
3. 46S6Zn4



4. 46S6Zn6



5. 46S6Zn8

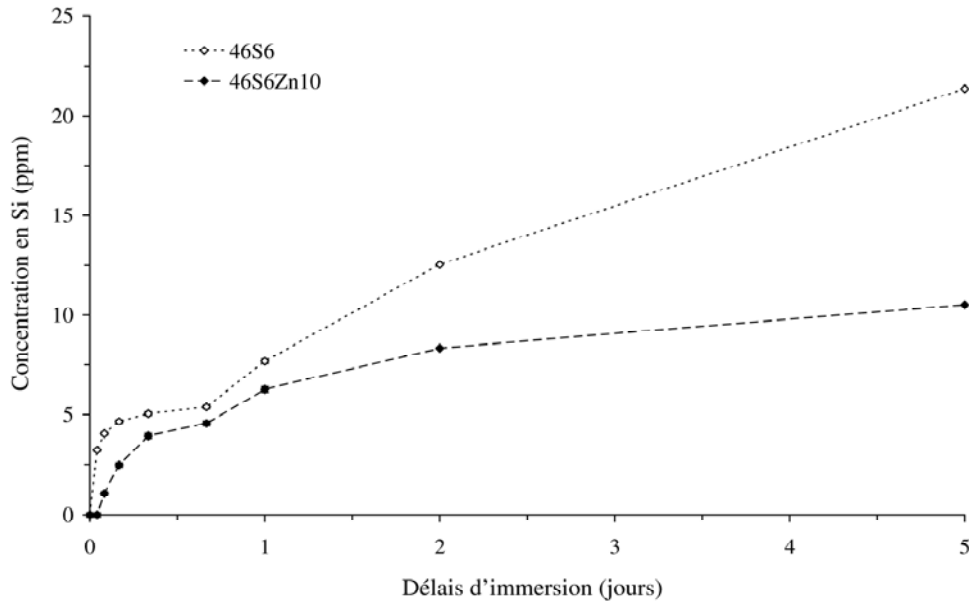


6. 46S6Zn10

**Figure 8.7.** Surface des verres pour différentes teneurs en zinc ( $\times 10\,000$ ) après 30 jours d'immersion dans le SBF.

## 2. Effet du zinc sur la composition du SBF lors des tests *in vitro*

L'évolution de la composition du SBF en fonction du temps d'immersion des échantillons de 46S6 et de 46S6Zn10 est présentée sur les figures 8.8, 8.9 et 8.10. Aucun relargage en zinc n'a été observé.



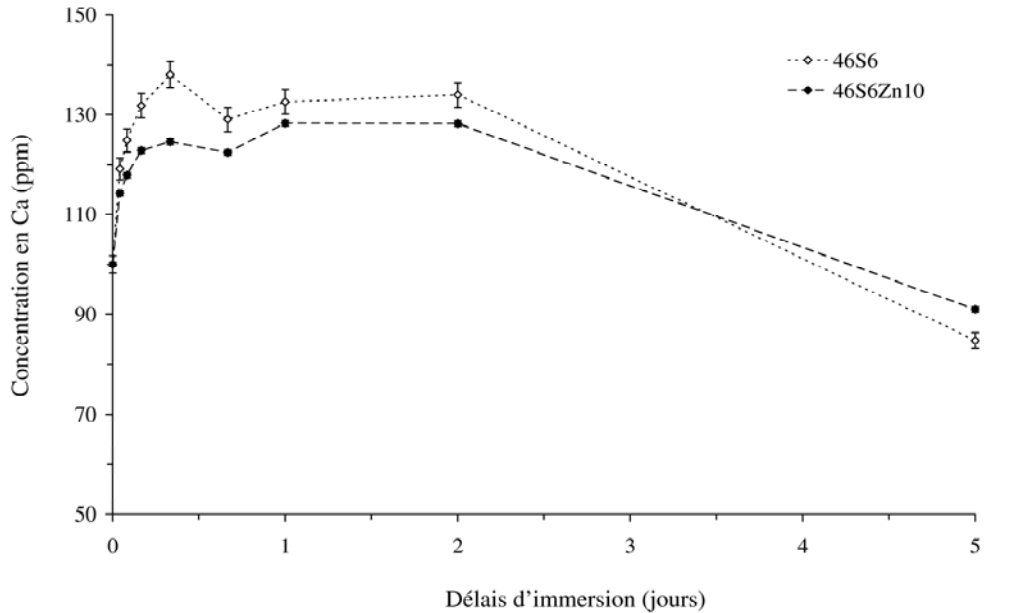
**Figure 8.8.** Concentration en Si dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Sur la figure 8.8 sont représentées les évolutions des concentrations en silicium pour les deux compositions étudiées. Au temps zéro, la quantité de silicium dans le SBF est nulle ; le relargage de silicium ne commence à être observé qu'après 1 heure d'immersion dans le SBF pour le 46S6Zn10, alors qu'il débute instantanément pour le 46S6.

Puis, de la même manière que pour le verre pur ou le verre dopé au magnésium, la concentration en silicium augmente progressivement avec le temps d'immersion dans le SBF. La valeur limite atteinte à 5 jours pour le 46S6Zn10 reste néanmoins très inférieure à celle du 46S6 (environ 10 ppm contre 21). Le relargage du silicium et donc la dissolution du réseau vitreux sont ralentis par l'introduction du zinc dans la matrice du verre.



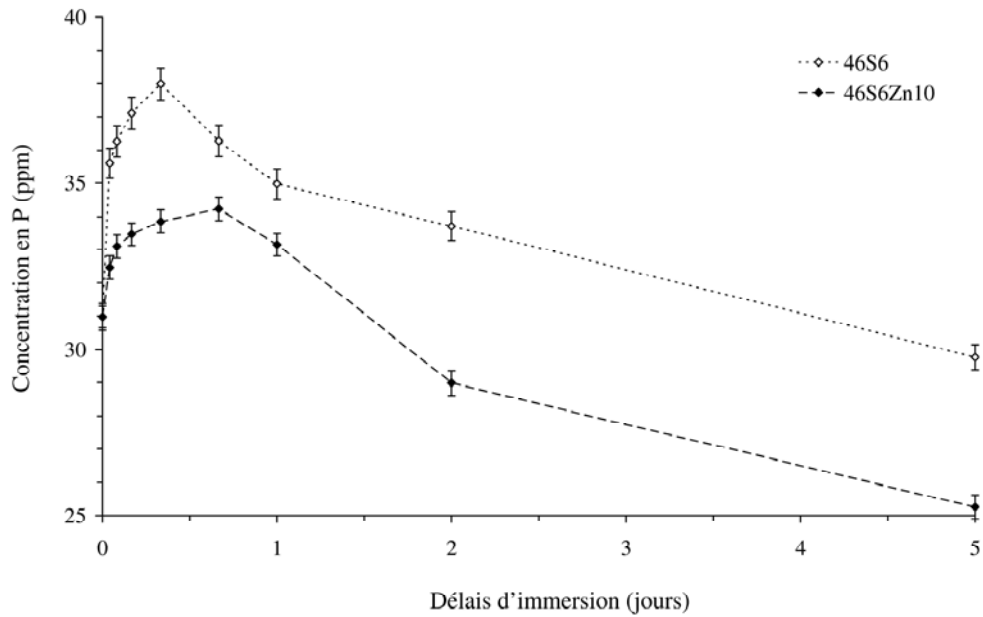
La figure 8.9 présente les évolutions de la concentration en calcium et la figure 8.10 les évolutions de la concentration en phosphore dans le SBF après immersion des verres 46S6 et 46S6Zn10. Les variations de ces concentrations pour le 46S6Zn10 sont très proches de celles déjà observées pour le 46S6Mg120 (figure 7.9 et 7.10).



**Figure 8.9.** Concentration en Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Ainsi, de la même manière que pour le 46S6Mg120, on observe une étape de désalcalinisation de la surface du verre (relargage des ions alcalins et alcalino-terreux,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ), avec une augmentation de la concentration en calcium jusqu'à 24 heures d'immersion. Cette dernière demeure ensuite constante jusqu'à 2 jours, puis diminue jusqu'à 5 jours d'immersion. A l'issue des 5 jours, la concentration en calcium est quasiment identique à la concentration de départ dans le SBF, soit 100 ppm environ. On constate également que la quantité de calcium relargué est supérieure à celle du 46S6 (10 ppm de plus en moyenne pendant les deux premiers jours).

Le phosphore est quant à lui relargué durant les 16 premières heures. Un maximum de 34 ppm est atteint, puis sa concentration décroît fortement. Après 5 jours d'immersion, il reste un peu plus de 25 ppm de phosphore dans le SBF ; ce dernier a donc été consommé pour la croissance de la couche de phosphate de calcium à la surface de 46S6Zn10.



**Figure 8.10.** Concentration en P dans le SBF en fonction du temps d'immersion

### 3. Résumé des observations pour les verres dopés au zinc

La présence de zinc ralentit légèrement la dissolution de la matrice vitreuse. Les quantités de silicium et de calcium relarguées par le 46S6Zn10 sont légèrement inférieures à celles relarguées par le verre pur. Cependant, à partir de 2 jours d'immersion, le calcium et le phosphore sont détectés de façon prédominante à la surface du 46S6Zn10.

L'introduction de zinc dans la matrice vitreuse a également pour effet de modifier fortement la cinétique de formation, ainsi que la cristallisation (morphologie et taille des cristaux) de la couche d'hydroxyapatite lors des tests *in vitro*.



## Chapitre 9

### Etude de la bioactivité du verre 46S6 dopé au strontium

Après l'influence de l'introduction de magnésium et de zinc dans la matrice du verre, une étude comparable à celles présentées dans les chapitres précédents a été effectuée sur l'effet du strontium.

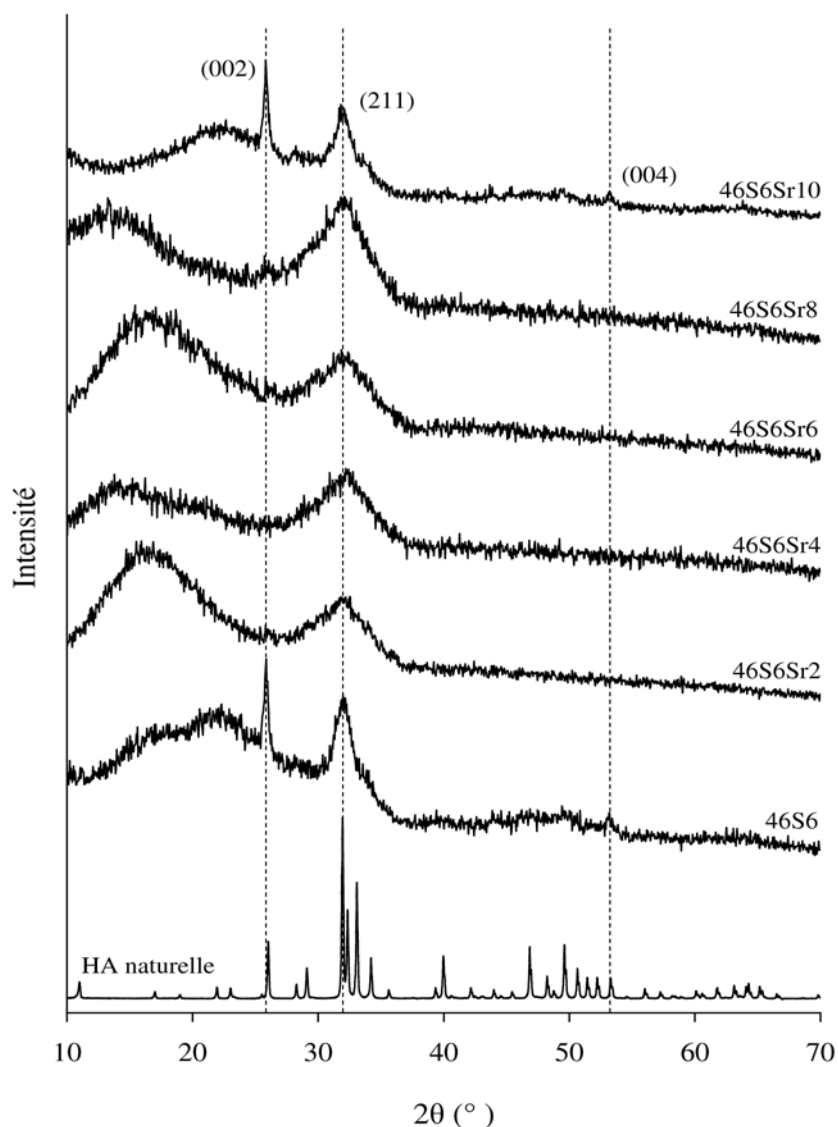
Différentes compositions de verres dopés au strontium, de 0,02 à 0,1 % (% massique) de strontium introduit, ont été étudiées afin de mieux comprendre l'influence de cet élément sur la réactivité des verres bioactifs après immersion.

#### 1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre 46S6 dopé au strontium après immersion dans le SBF

##### 1.1. Etude des surfaces par DRX

La figure 9.1 présente les diagrammes de diffraction de la surface du 46S6 et des verres dopés au strontium 46S6Sr $X$  ( $2 \leq X \leq 10$ , avec  $X$  le pourcentage en strontium introduit  $\times 100$ ) après 30 jours d'immersion dans le SBF. Le diffractogramme de l'hydroxyapatite naturelle sert de référence [99].

Les verres dopés au strontium présentent deux comportements distincts. D'une part, le diagramme de diffraction des rayons X du 46S6Sr10 est similaire à celui du 46S6. La couche d'hydroxyapatite formée en surface des verres est cristallisée : on observe le groupe de raie à  $32^\circ$  ( $2\theta$ ), correspondant aux réflexions des plans (211), (112) et (300), ainsi que les deux raies de diffraction à  $26^\circ$  et  $53^\circ$  ( $2\theta$ ), qui correspondent respectivement aux réflexions des plans (002) et (004) de l'apatite. D'autre part, les diffractogrammes des verres 46S6Sr2, 46S6Sr4, 46S6Sr6 et 46S6Sr8 ne présentent qu'une raie de diffraction large à environ  $32^\circ$  ( $2\theta$ ). Pour ces compositions, les raies à  $26^\circ$  et  $53^\circ$  ( $2\theta$ ) n'apparaissent pas. Seule une très faible raie à  $26^\circ$  ( $2\theta$ ) est observable sur le diffractogramme de la surface du 46S6Sr8.

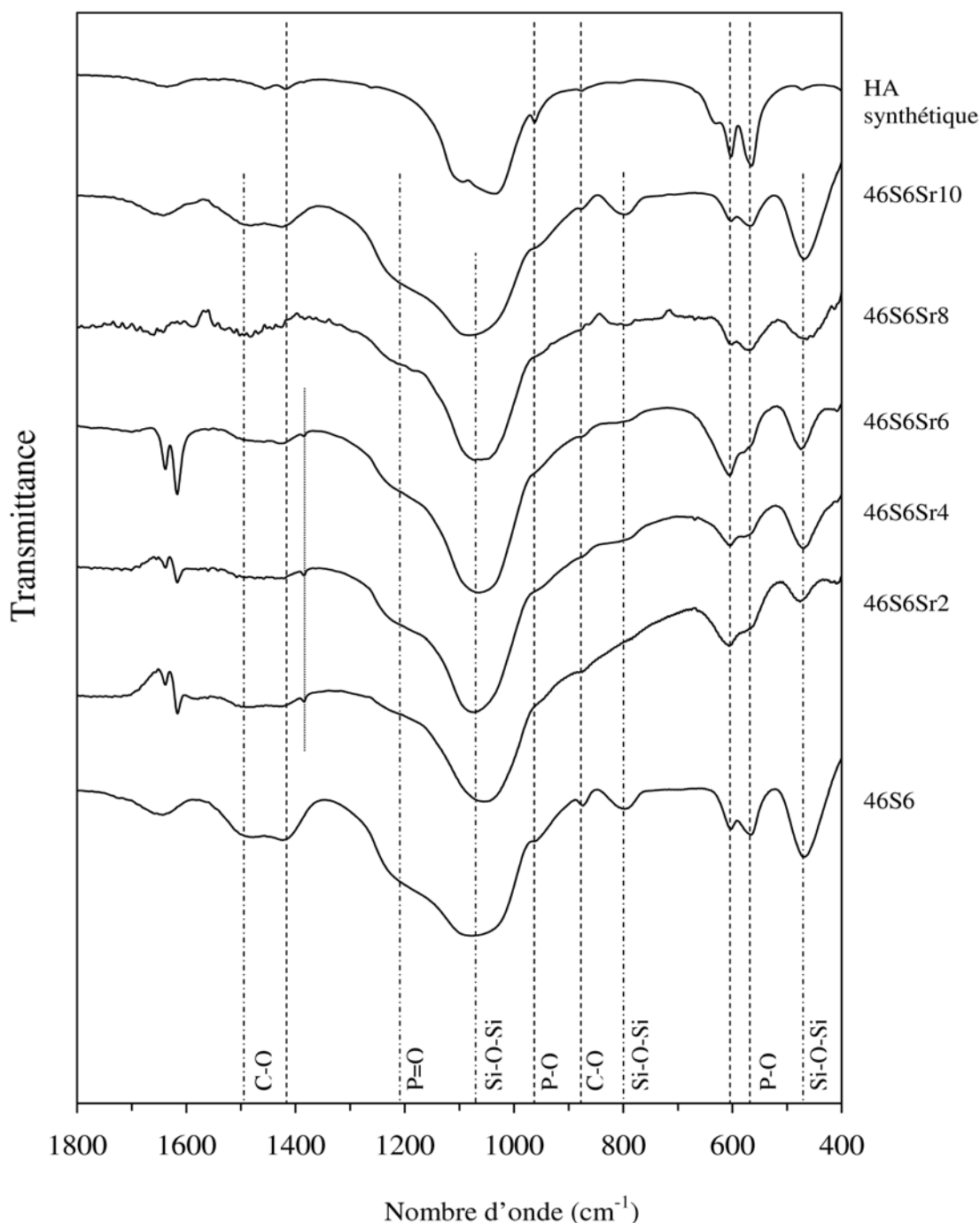


**Figure 9.1.** DRX de la surface des verres dopés au strontium après 30 jours d’immersion

## 1.2. Analyse de la couche formée en surface par FTIR

Les spectres IR de la couche recueillie en surface du 46S6 et des verres dopés en strontium après 30 jours d’immersion sont présentés sur la figure 9.2. Cinq bandes sont communes entre les spectres des verres de différents teneurs en strontium et le spectre de l’hydroxyapatite naturelle. On retrouve ainsi sur l’ensemble de ces spectres les bandes P-O à 565, 603 et 961  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi que les bandes C-O à 873 et 1420  $\text{cm}^{-1}$ . Elles confirment la formation d’une couche d’hydroxyapatite carbonatée à la surface des verres de différentes compositions [87].

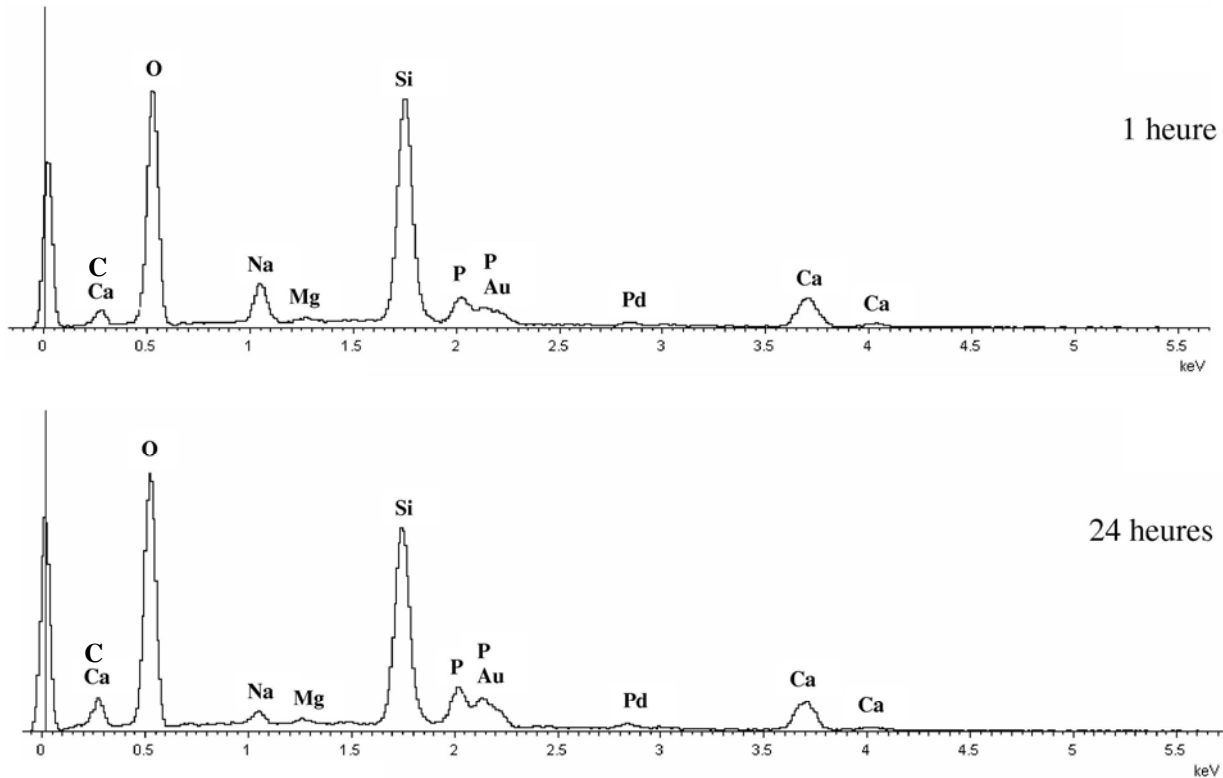
Une troisième bande C-O, non commune avec le spectre de l'hydroxyapatite est également observable à  $1470\text{ cm}^{-1}$  pour l'ensemble des verres. Les verres dopés avec des teneurs en strontium comprises entre 0,02 et 0,06 % présentent plusieurs bandes dont les intensités diminuent fortement ; il s'agit des bandes P-O à 565 et  $961\text{ cm}^{-1}$ , Si-O-Si à  $795\text{ cm}^{-1}$  et à C-O à  $873\text{ cm}^{-1}$ . Enfin, pour ces mêmes compositions, une nouvelle bande non référencée apparaît à  $1380\text{ cm}^{-1}$ .



**Figure 9.2.** Spectres IR de la surface des verres dopés au strontium après 30 jours d'immersion

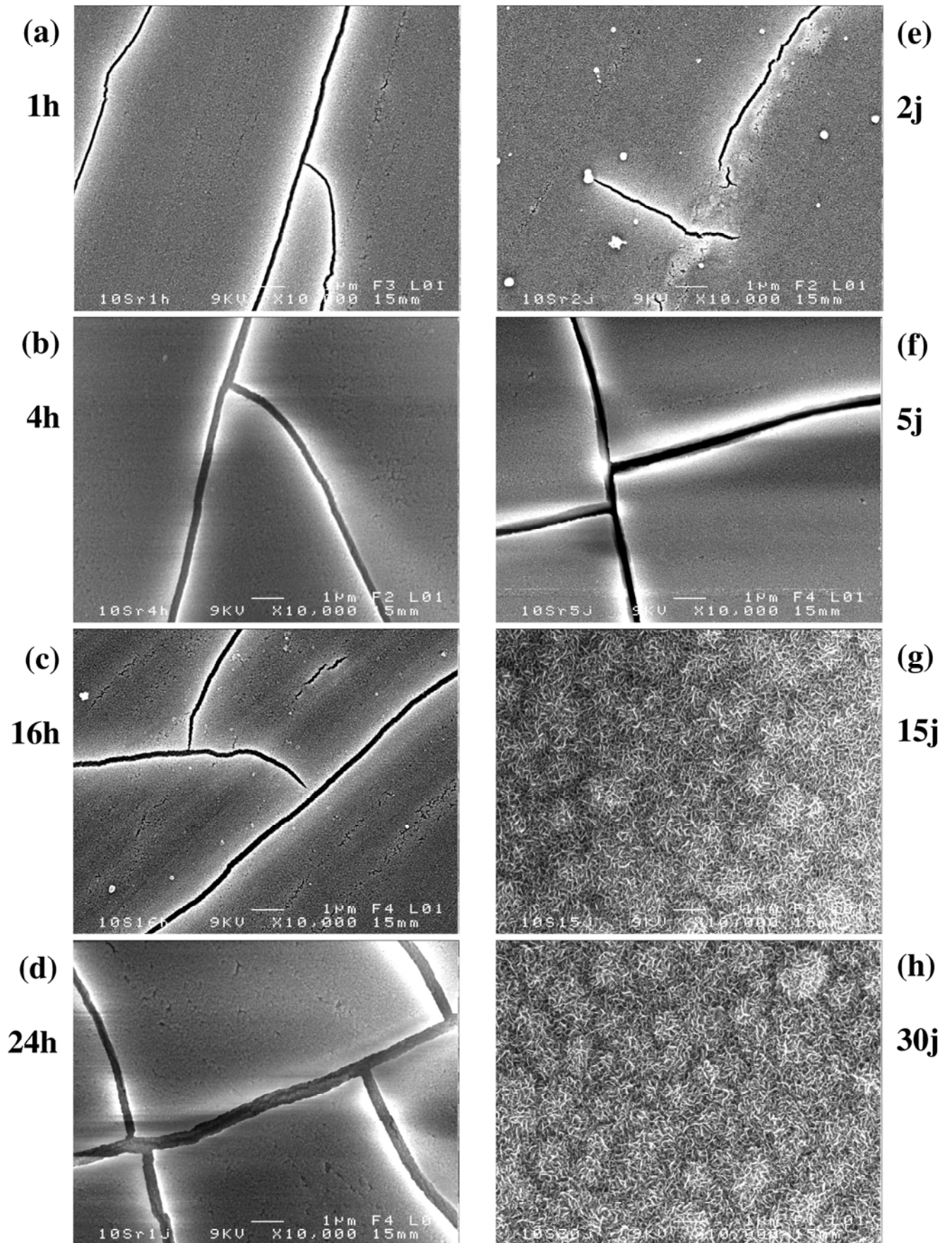
### 1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion

Les micrographies de la surface du verre 46S6Sr10 après différents délais d'immersion sont représentées sur la figure 9.4. Chaque micrographie a été faite au grossissement ( $\times 10\,000$ ) et réalisée après différents délais d'immersion, compris entre 1 heure et 30 jours. Les analyses EDS associées à chaque délai d'immersion sont exposées dans les figures 9.3, 9.5 et 9.6.



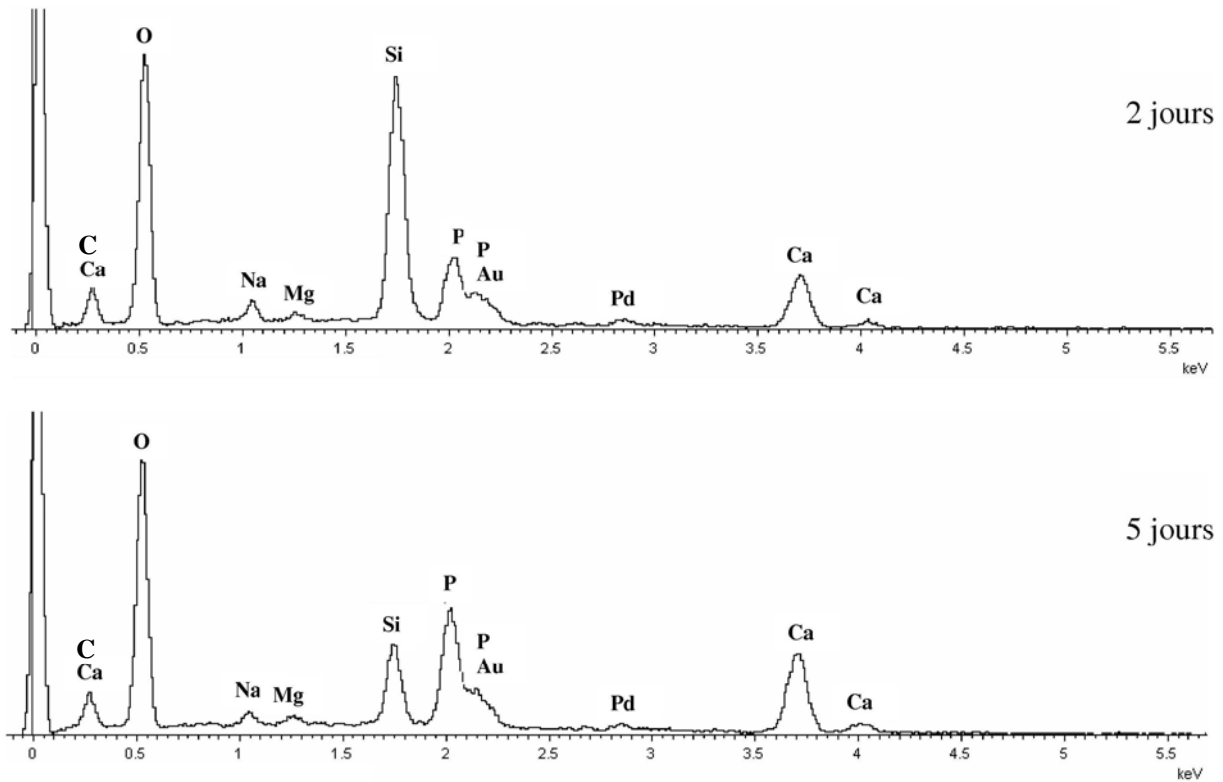
**Figure 9.3.** Spectres EDS de la surface du 46S6Sr10 après 1 heure et 1 jour d'immersion

Entre 1 heure et cinq jours, la couche observée en surface du 46S6Sr10 est constituée de petits amas sphériques compactés entre eux et présente de nombreuses craquelures (figure 9.4). Cette morphologie a été également observée à la surface du 46S6, du 46S6Mg120 et du 46S6Zn10 pour les courts délais d'immersion (entre 1 heure et 1 ou 2 jours). D'après les analyses par EDS des figures 9.3 et 9.5, entre 1 heure et 2 jours, la couche formée en surface est très majoritairement constituée de silicium et d'oxygène. Cette couche riche en  $\text{SiO}_2$  est alors peu à peu recouverte d'une seconde couche de phosphate de calcium. Cette dernière devient prédominante à partir de 5 jours d'immersion dans le SBF. Cependant, à 5 jours, aucune cristallisation n'est encore observée.

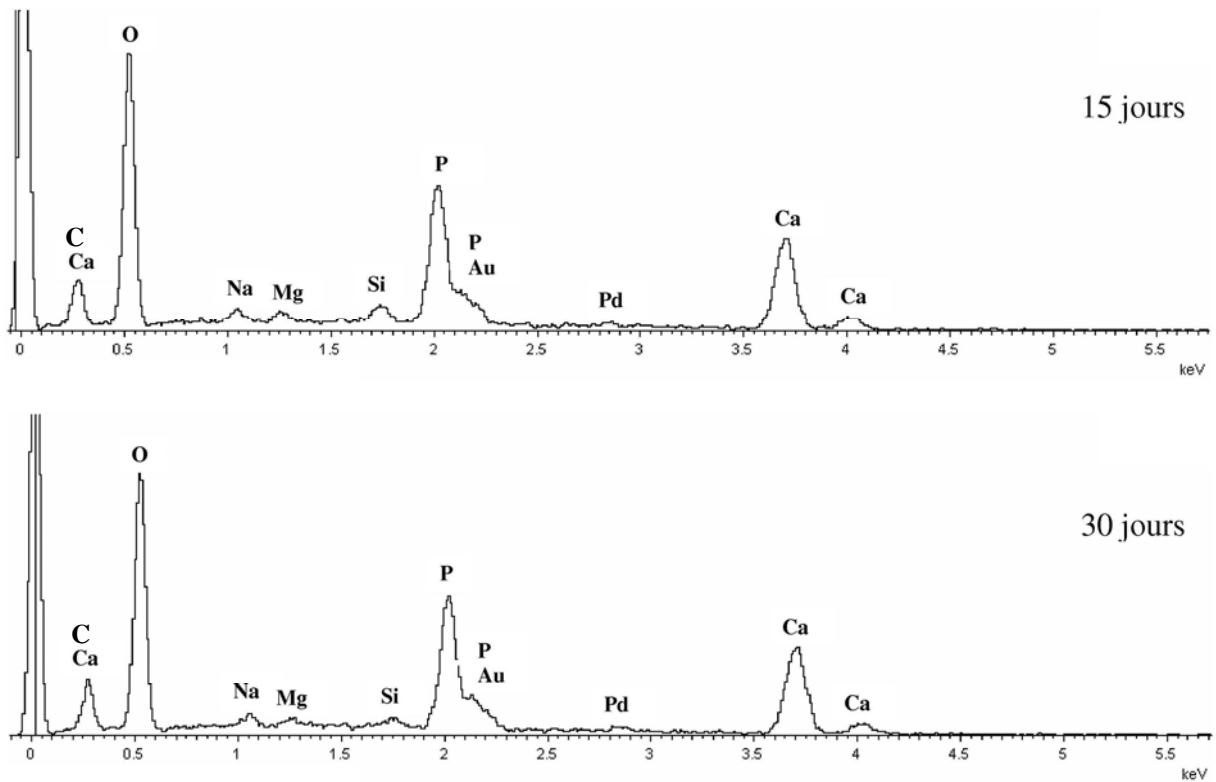


**Figure 9.4.** Surface du verre 46S6Sr10 ( $\times 10\,000$ ) après différents délais d'immersion





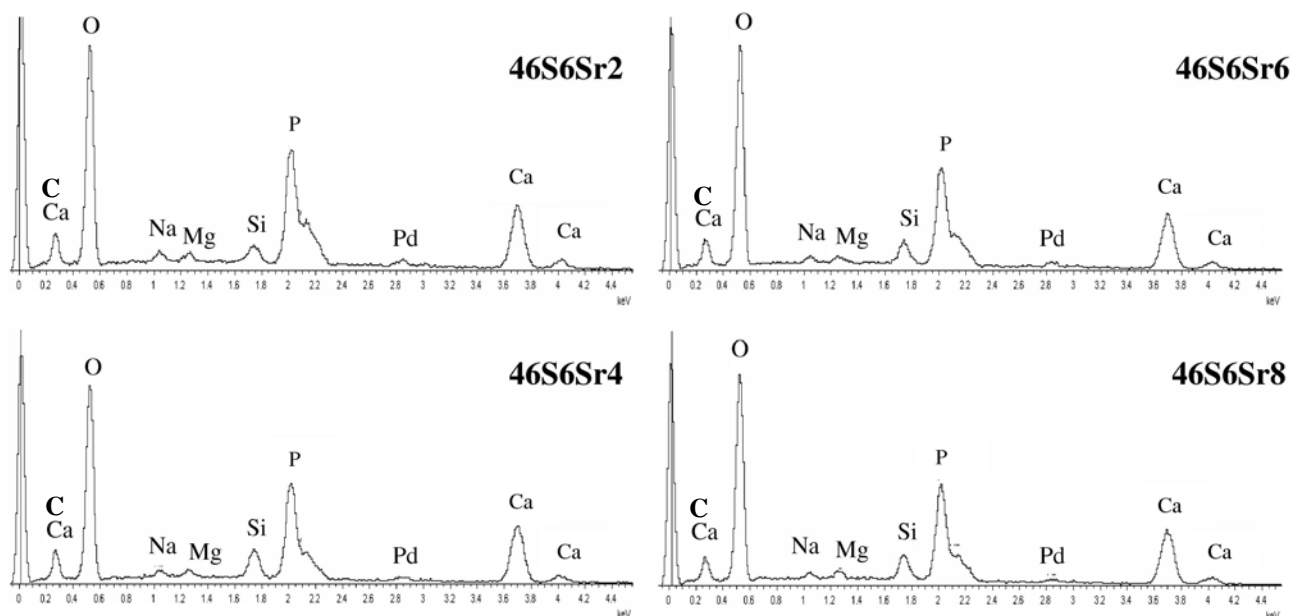
**Figure 9.5.** Spectres EDS de la surface du 46S6Sr10 après 2 et 5 jours d'immersion



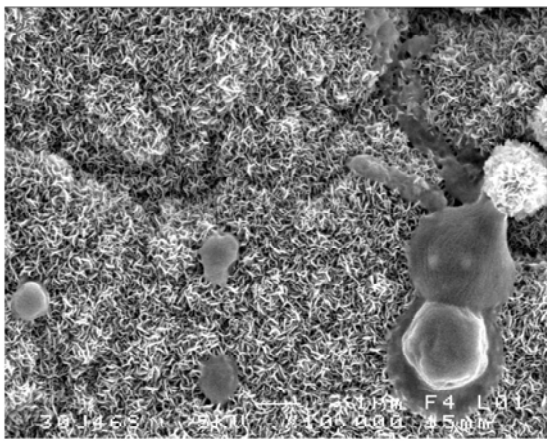
**Figure 9.6.** Spectres EDS de la surface du 46S6Sr10 après 15 et 30 jours d'immersion

A partir de 15 jours d'immersion, le 46S6Sr10 présente une surface recouverte par un dépôt de particules en forme d'aiguilles (figure 9.4). La couche d'hydroxyapatite continue de se développer avec le temps, car on remarque un relief plus important après 30 jours d'immersion. L'analyse EDS présentée sur la figure 9.6 confirme la présence de quantités majoritaires de calcium et de phosphore pour ces mêmes délais. Entre 15 et 30 jours, la quantité de silicium détecté en surface diminue, ce qui est en accord avec un épaissement de la couche d'hydroxyapatite. Le verre 46S6Sr10 présente donc peu de différences lors de l'observation au MEB et des analyses EDS avec le verre pur 46S6. On note également la présence de magnésium sur l'ensemble des spectres présentés.

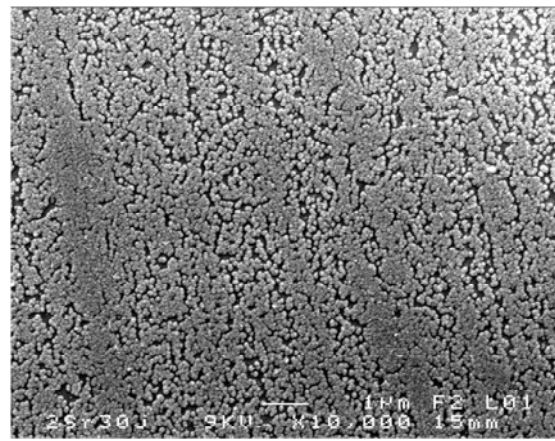
La figure 9.8 présente les micrographies (grossissement  $\times 10\,000$ ) après 30 jours d'immersion de la surface des différents verres dopés au strontium. La morphologie de la couche d'hydroxyapatite évolue en fonction de la teneur en strontium introduite. Après 30 jours d'immersion dans le SBF, aucune cristallisation n'est observée à la surface des 46S6Sr2, 46S6Sr4, 46S6Sr6 et 46S6Sr8. D'après les analyses EDS (figure 9.7), il s'agit néanmoins d'une couche de phosphate de calcium. A l'inverse, le 46S6Sr10 présente une couche d'hydroxyapatite bien cristallisée, comparable à celle présente en surface du 46S6.



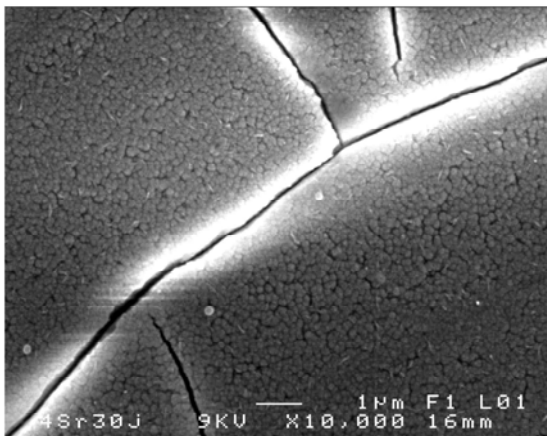
**Figure 9.7.** Spectres EDS des verres 46S6Sr2, 46S6Sr4, 46S6Sr6 et 46S6Sr8 après 30 jours d'immersion



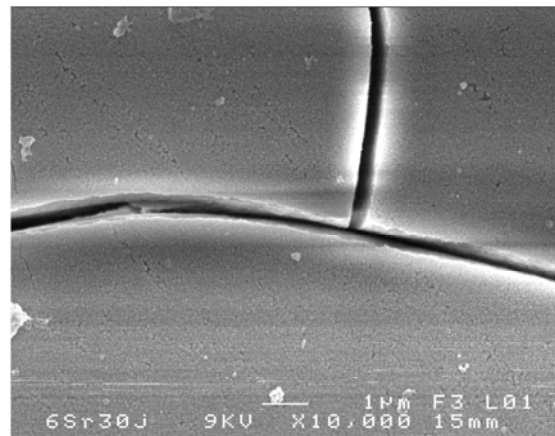
**1. 46S6**



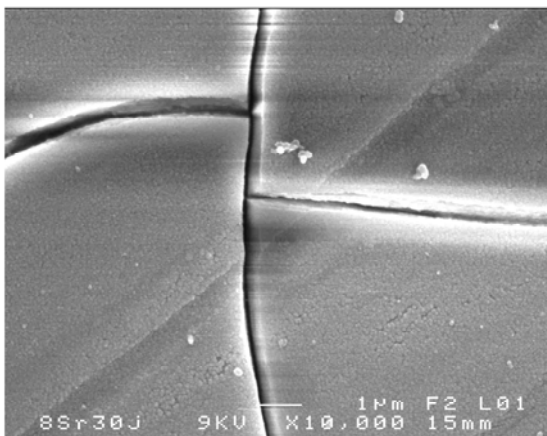
**2. 46S6Sr2**



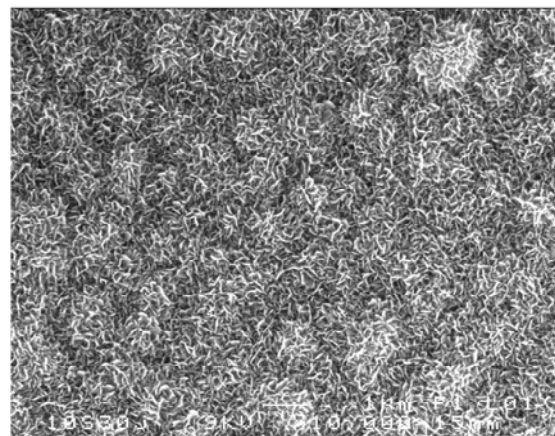
**3. 46S6Sr4**



**4. 46S6Sr6**



**5. 46S6Sr8**

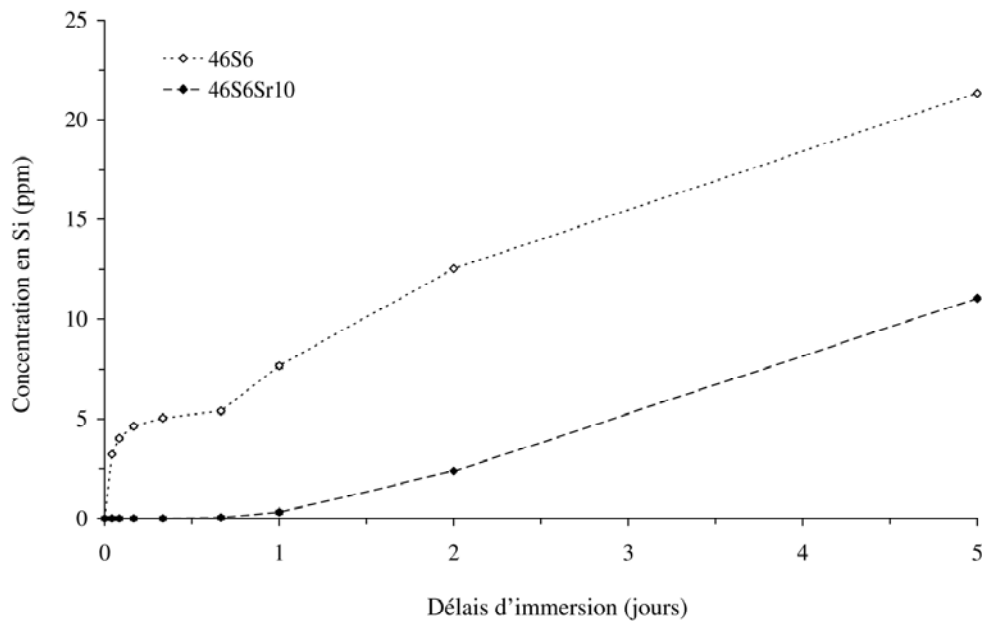


**6. 46S6Sr10**

**Figure 9.8.** Surface des verres pour différentes teneurs en strontium ( $\times 10\,000$ ) après 30 jours d'immersion dans le SBF.

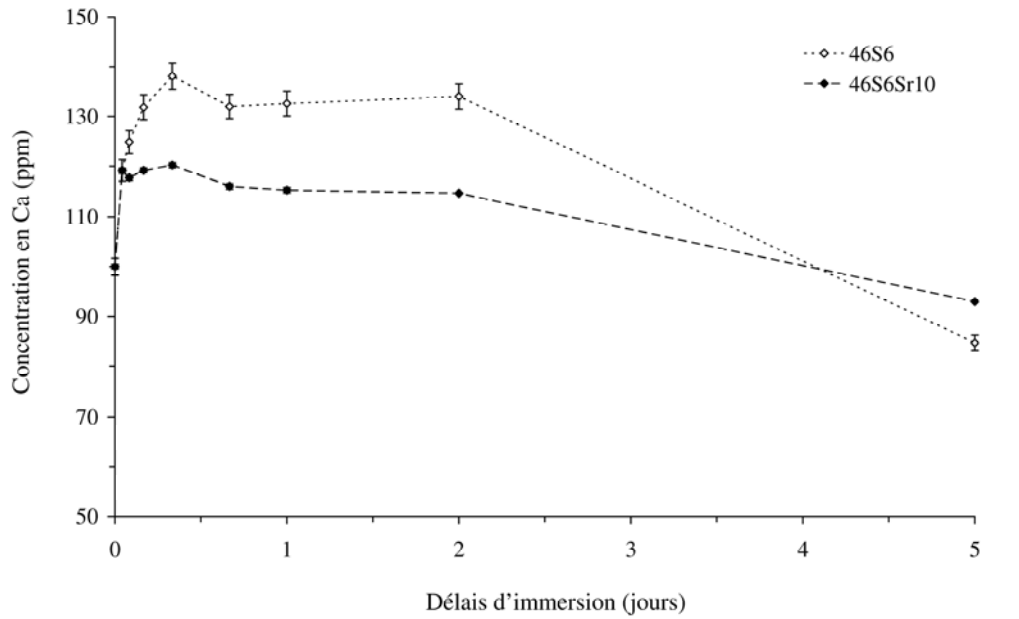
## 2. Effet du strontium sur la composition du SBF lors des tests *in vitro*

L'évolution de la composition du SBF en fonction du temps d'immersion des échantillons de 46S6 et de 46S6Sr10 est présentée sur les figures 9.9, 9.10 et 9.11. Aucun relargage en strontium n'a été observé.



**Figure 9.9.** Concentration en Si dans le SBF en fonction du temps d'immersion

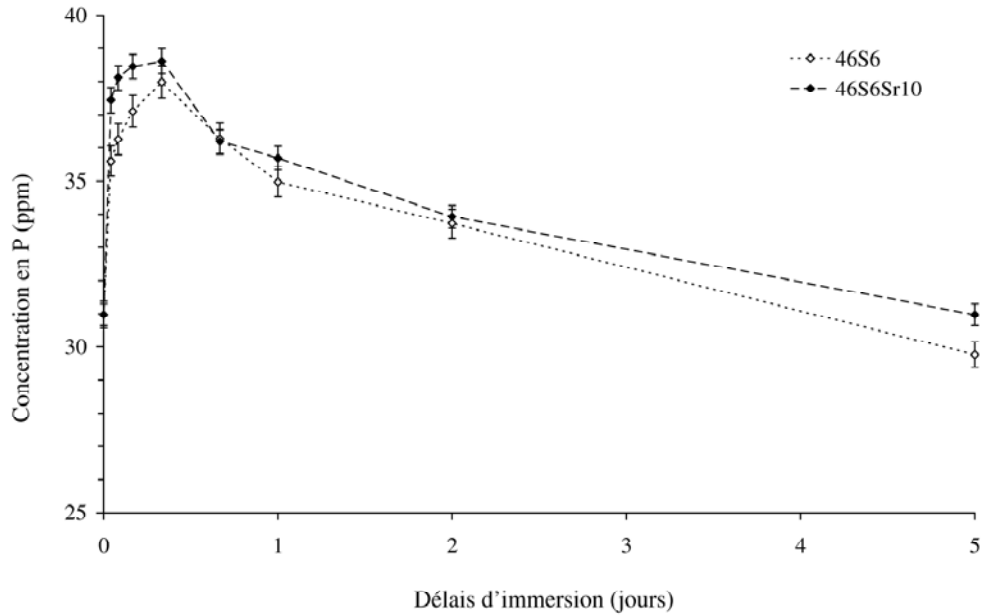
L'évolution de la concentration en silicium dans le SBF pendant les cinq premiers jours d'immersion est représentée sur la figure 9.9 en comparaison avec le verre de référence 46S6. La concentration initiale en silicium dans le SBF est nulle. Le verre 46S6Sr10 ne relargue pas de silicium pendant les 24 premières heures, alors qu'après un jour d'immersion, le 46S6 a relargué environ 7 ppm de silicium. Après 1 jour, le verre 46S6Sr10 commence à relarguer de façon linéaire du silicium, jusqu'à atteindre une valeur de 11 ppm après 5 jours d'immersion. A l'issue des cinq jours, le 46S6 a relargué 22 ppm, soit deux fois plus de silicium que le 46S6Sr10. L'introduction de strontium ralentit donc la dissolution de la matrice vitreuse, en renforçant le réseau du verre. Cet effet a été observé dans le Chapitre 8 avec l'introduction de zinc ; cependant, dans le cas du zinc cet effet était beaucoup moins prononcé.



**Figure 9.10.** Concentration en Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Sur la figure 9.10, le calcium est relargué en quantité moins importante pour le 46S6Sr10 : le maximum atteint est de 120 ppm, alors qu'il est de 136 ppm pour le verre pur. Pour les deux compositions, on observe le relargage pendant les 8 premières heures, suivie d'une stabilisation de la concentration jusqu'à 2 jours d'immersion. Après deux jours, la concentration en calcium commence à décroître ; le calcium est alors incorporé en plus faibles quantités à la surface du verre 46S6Sr10, car la valeur limite atteinte après 5 jours d'immersion est supérieure à celle du SBF ayant contenu le 46S6.

La figure 9.11 présente l'évolution de la concentration en phosphore dans le SBF jusqu'à 5 jours d'immersion. Les relargages observés pour le 46S6 et le 46S6Sr10 suivent quasiment les mêmes variations : la concentration en calcium augmente pendant les 8 premières heures d'immersion, puis elle diminue progressivement jusqu'à cinq jours d'immersion.



**Figure 9.11.** Concentration en P dans le SBF en fonction du temps d'immersion

### 3. Résumé des observations pour les verres dopés au strontium

L'introduction de strontium dans la composition ralentit fortement la dissolution de la matrice vitreuse. Aucun relargage en silicium n'est observé pendant la première journée d'immersion et la quantité de calcium relarguée est également fortement diminuée. Le verre dopé au strontium est plus stable chimiquement.

Concernant la croissance et la cristallisation de la couche de phosphate de calcium, peu de différences sont observées entre le verre pur et le 46S6Sr10. Ce dernier est le seul verre dopé au strontium à présenter une surface cristallisée après 30 jours d'immersion ; les autres compositions sont recouvertes d'une couche de phosphate de calcium amorphe.



## Chapitre 10

### Influence de l'introduction des trois éléments dopants simultanément

Après avoir étudié l'influence de l'ajout des éléments dopants séparément, ces derniers ont été introduits simultanément afin d'observer leurs effets combinés sur la réactivité des verres lors des tests *in vitro*. Ce travail a fait l'objet d'un stage de M2 Chimie du Solide et Matériaux [100]. Deux compositions de verres dopés au magnésium, zinc et strontium ont été étudiées : le 46S6Os avec des teneurs en éléments dopants proches de celles de l'os mature et le 46S6Sup avec les teneurs maximum en éléments dopants.

Pour rappel, voici les compositions des verres dopés avec les trois éléments dopants simultanément :

	SiO <sub>2</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	% Mg	% Zn	% Sr
46S6 Sup	46	22,88	22,88	6	<b>1,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
46S5 Os	46	23 ,38	23 ,38	6	<b>0,5</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>

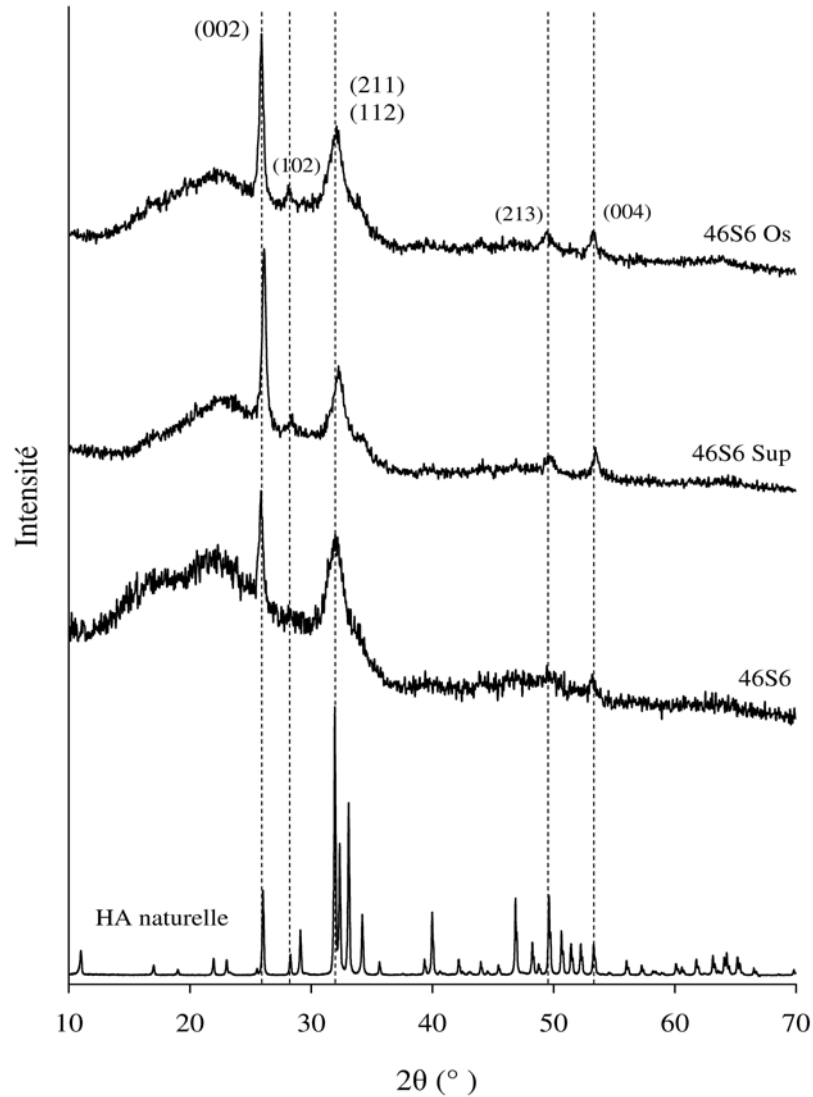
**Tableau 10.1.** Compositions en oxyde des verres 46S6 Sup et 46S6 Os (% massique)

#### 1. Caractérisations physico-chimiques de la surface du verre 46S6 dopé avec 3 éléments simultanément après immersion dans le SBF

##### 1.1. Etude des surfaces par DRX

La figure 10.1 présente les diagrammes de diffraction de la surface des verres dopés avec les trois éléments simultanément, comparativement au verre de référence 46S6, après 30 jours d'immersion dans le SBF. Le diffractogramme de l'hydroxyapatite naturelle sert de référence.



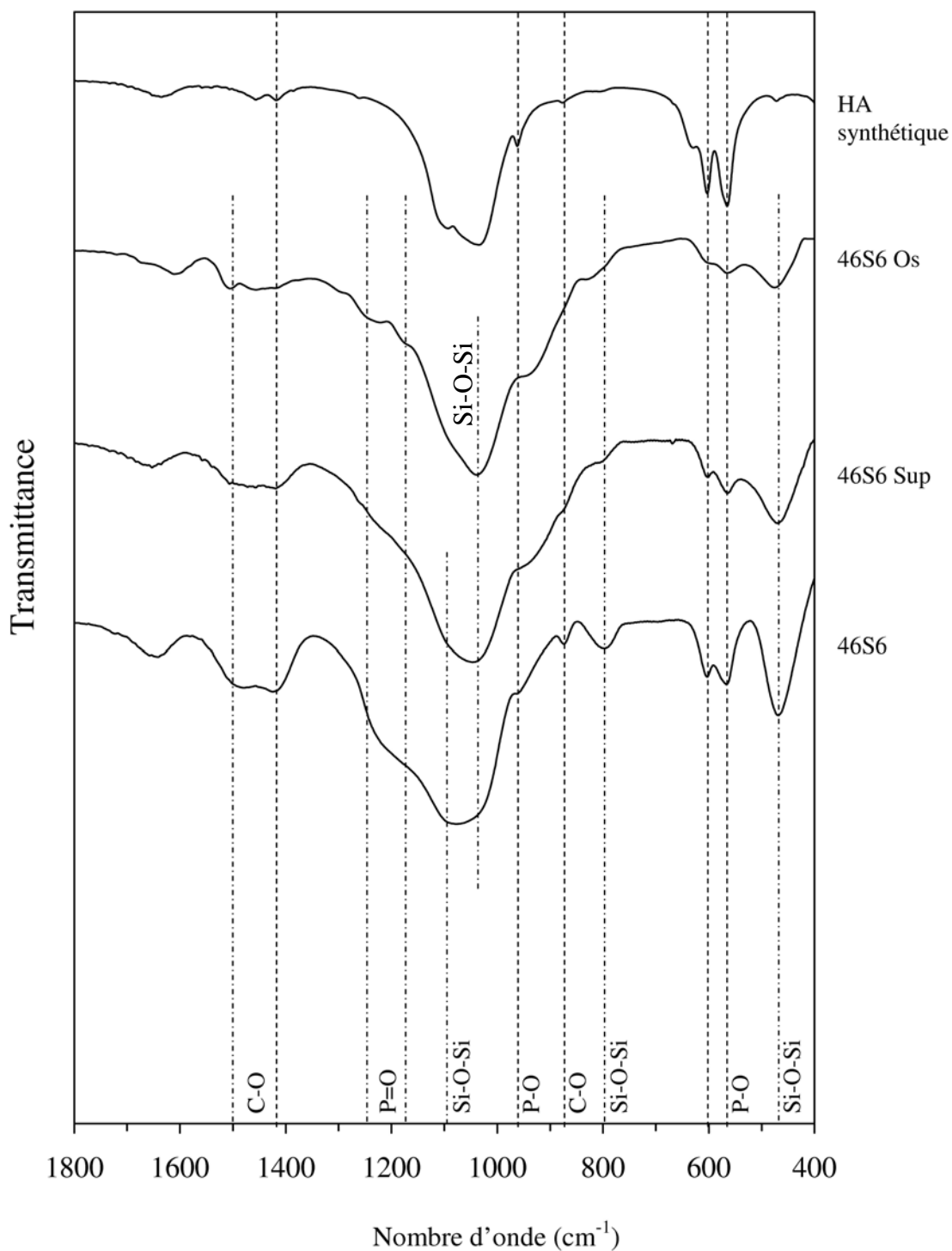


**Figure 10.1.** DRX de la surface des verres 46S6 Sup et 46S6 Os après 30 jours d'immersion et de l'hydroxyapatite naturelle [98]

Les diagrammes de diffraction du 46S6 Sup et du 46S6 Os présentent les raies de diffraction observées pour le 46S6 à 26, 32 et 53 ° ( $2\theta$ ), correspondant respectivement aux réflexions des plans (002), (211)/(112)/(300) pour le groupe de raies et (004). De nouvelles raies de diffraction sont également observées à environ 28 et 50° ( $2\theta$ ). Ces dernières correspondent aux réflexions du plan (102) à 28° ( $2\theta$ ) et du plan (213) à 50° ( $2\theta$ ). Les raies à 26 et 53° ( $2\theta$ ) sont également plus intenses sur les diffractogrammes du 46S6 Sup et du 46S6 Os que sur celui du verre pur. Cette tendance suggère une orientation préférentielle plus prononcée lors de la croissance des cristaux d'hydroxyapatite selon le plan (002) à la surface de ces verres.

## 1.2. Analyse de la couche formée en surface par FTIR

Les spectres IR de la couche recueillie en surface du 46S6 et des 46S6 Os et 46S6 Sup, après 30 jours d'immersion, sont présentés sur la figure 10.2.



**Figure 10.2.** Spectres IR de la surface des verres 46S6 Sup et 46S6 Os après 30 jours d'immersion dans le SBF

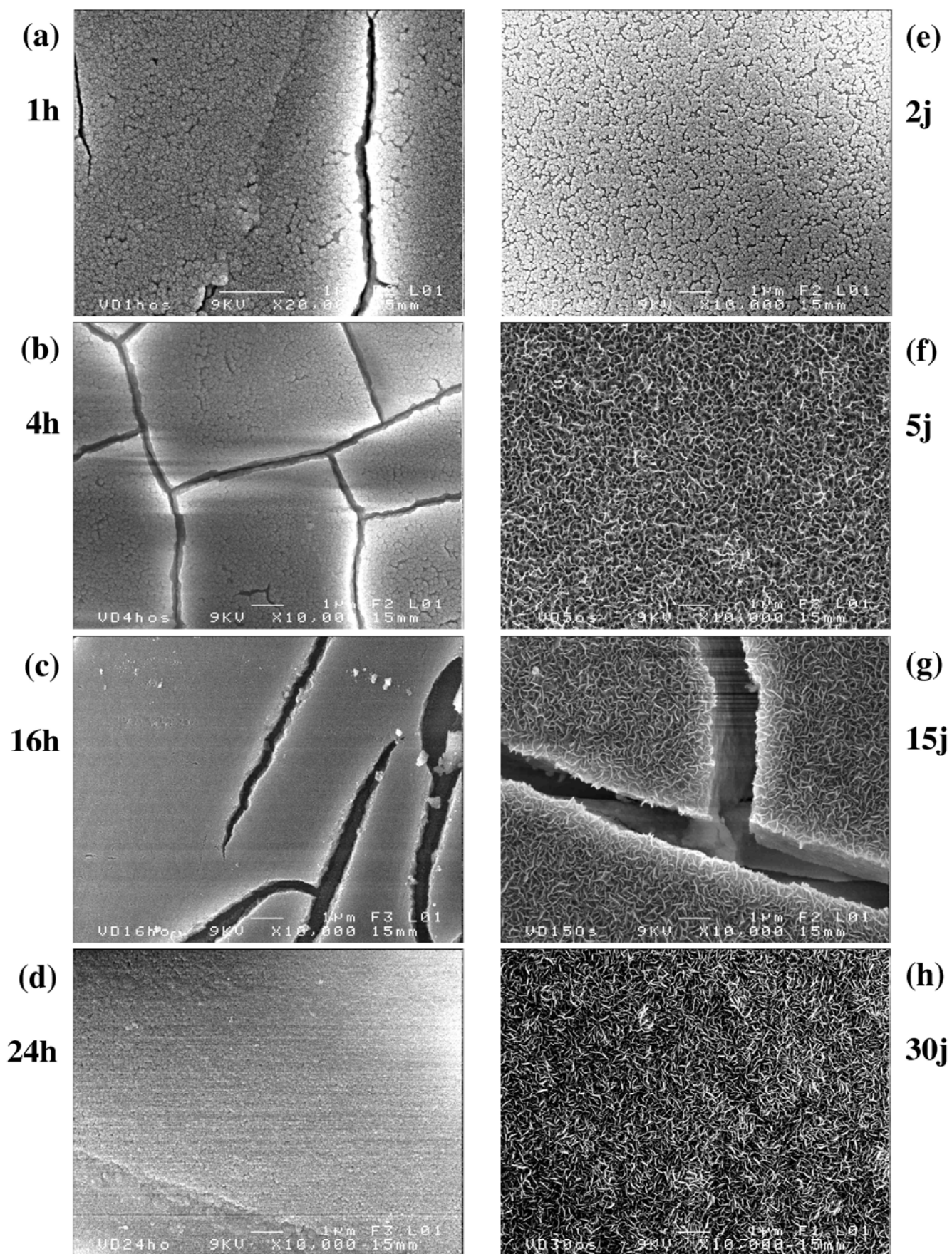
Cinq bandes sont communes entre les spectres du verre pur, ceux des deux verres dopés et le spectre de l'hydroxyapatite synthétique. On retrouve ainsi sur l'ensemble de ces spectres les bandes P-O à 565, 603 et 961  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi que les bandes C-O à 873 et 1420  $\text{cm}^{-1}$ . De ce fait, la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée est confirmée à la surface des verres de différentes compositions. La bande d'absorption observée à 1640  $\text{cm}^{-1}$  correspond à l'une des bandes infrarouges du dioxyde de carbone atmosphérique. Une troisième bande C-O, non commune avec le spectre de l'hydroxyapatite est également observable à 1470  $\text{cm}^{-1}$  sur les spectres des trois verres. Enfin, les verres présentent plusieurs bandes Si-O-Si à 470, 795 et 1040/1080  $\text{cm}^{-1}$  et de nouvelles bandes P=O à 1190 et 1250  $\text{cm}^{-1}$ .

Plusieurs variations d'intensité sont également observées sur le spectre du 46S6 Os. Les bandes P=O à 1190 et 1250  $\text{cm}^{-1}$  sont plus prononcées, contrairement aux bandes Si-O-Si et C-O à 470, 795 et 873  $\text{cm}^{-1}$ , dont les intensités diminuent fortement. Ces diminutions d'intensité sont également observées sur le spectre du 46S6 Sup.

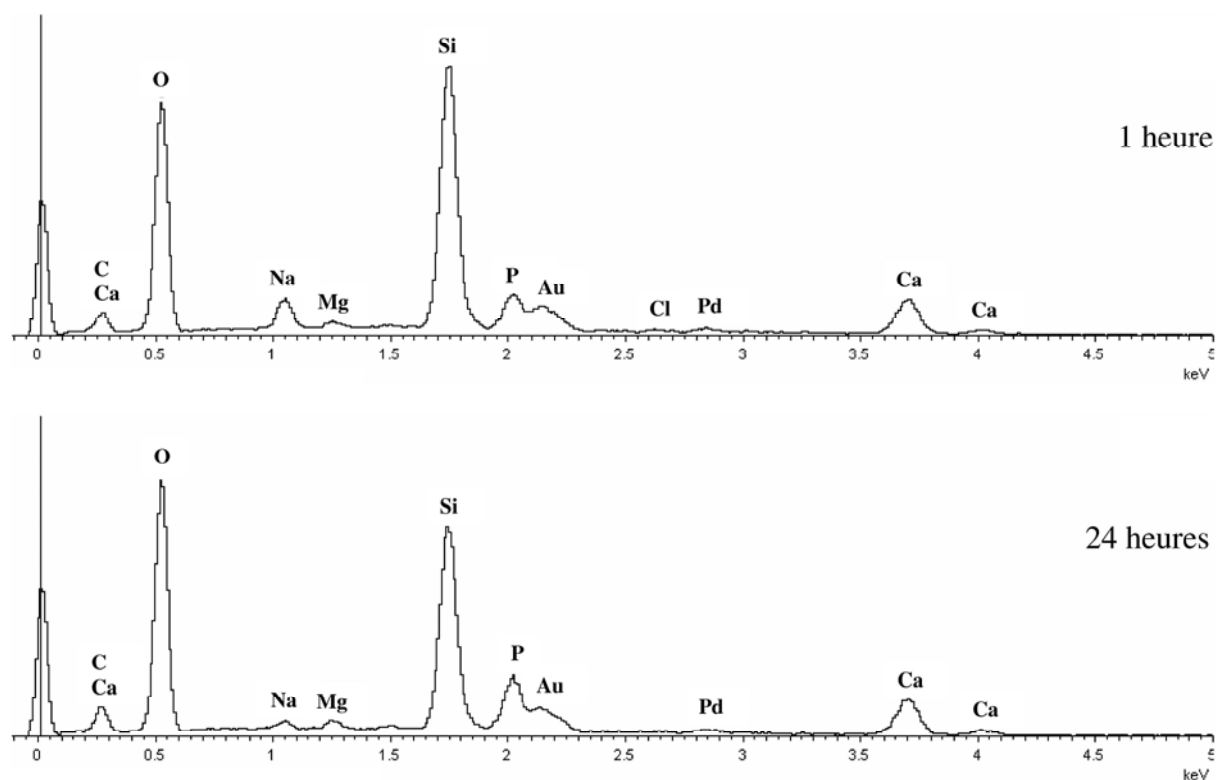
### 1.3. Morphologie des échantillons et analyse des surfaces après immersion

Les micrographies de la surface du verre 46S6 Os après différents délais d'immersion sont représentées sur la figure 10.3. Chaque micrographie a été faite au grossissement ( $\times 10\,000$ ) et réalisée après différents délais d'immersion, compris entre 1 heure et 30 jours. La figure 10.8 présente également des micrographies de la surface du 46S6 Os, mais à un grossissement supérieur ( $\times 20\,000$ ) et pour les délais de 5, 15, 30 et 40 jours d'immersion. Les analyses EDS associées à chaque délai d'immersion sont exposées dans les figures 10.4, 10.5, 10.6 et 10.7.

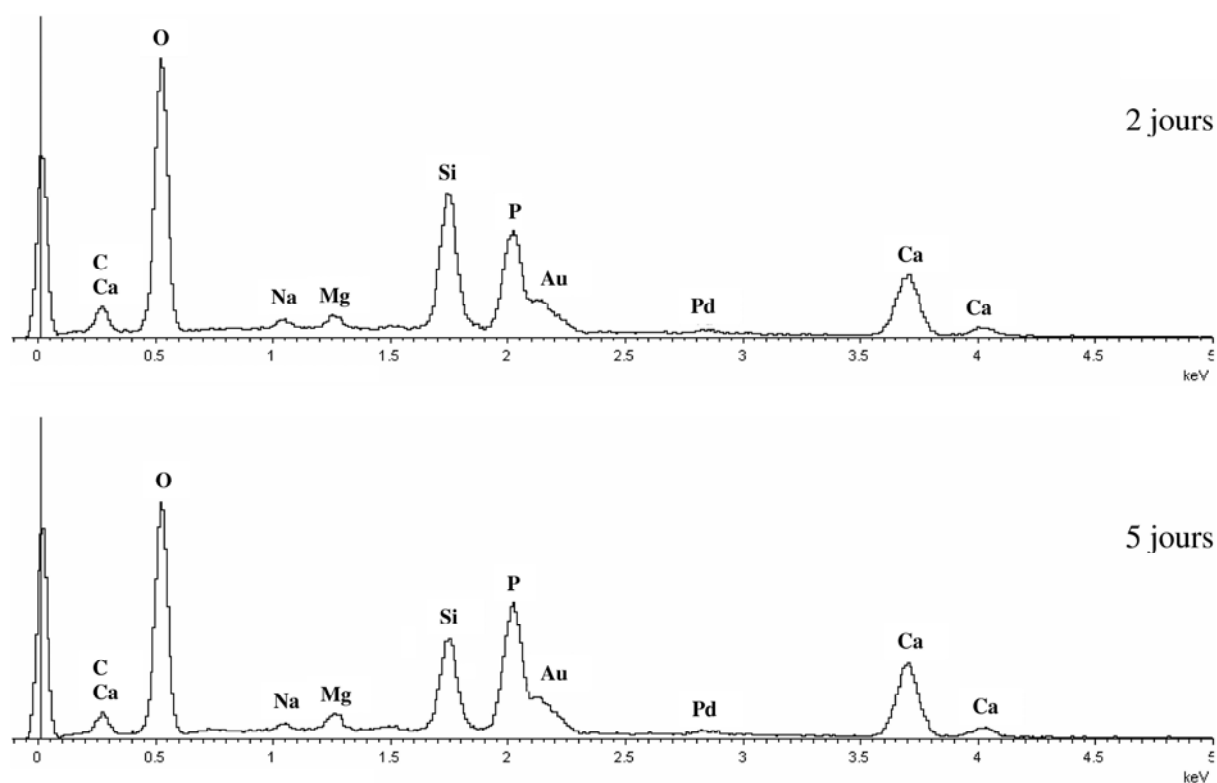
Sur la figure 10.3, on remarque qu'entre 1 heure et deux jours la couche formée en surface du 46S6 Os est constituée de petits amas sphériques compactés entre eux et présente de nombreuses craquelures. Cette morphologie a été précédemment observée à la surface de l'ensemble des différentes compositions de verres étudiées lors des courts délais d'immersion (entre 1 heure et 1 ou 2 jours). Les analyses EDS (figures 10.4 et 10.5) nous indiquent que la couche formée en surface est majoritairement constituée de silicium et d'oxygène. Cependant à partir d'un jour d'immersion, on constate une diminution de la quantité de silicium détectée au profit des quantités de calcium et phosphore, qui augmentent progressivement.



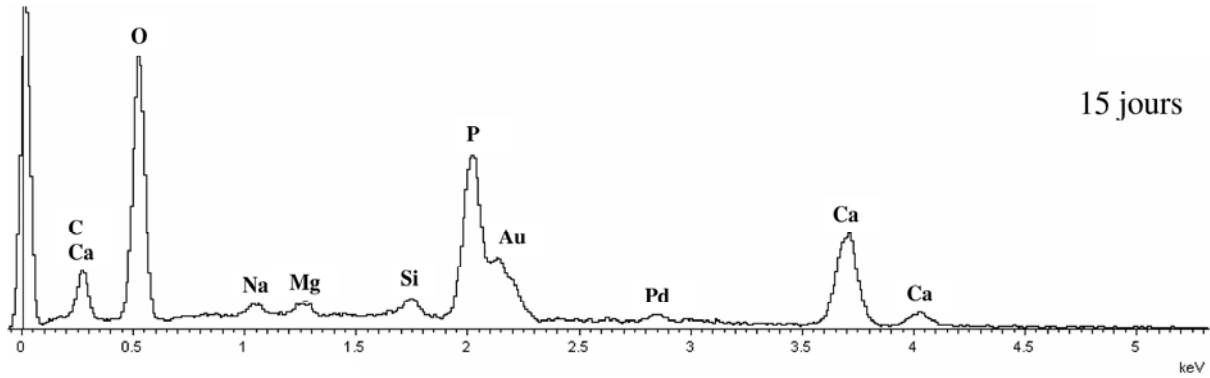
**Figure 10.3.** Surface du verre 46S6 Os ( $\times 10\,000$ ) après différents délais d'immersion



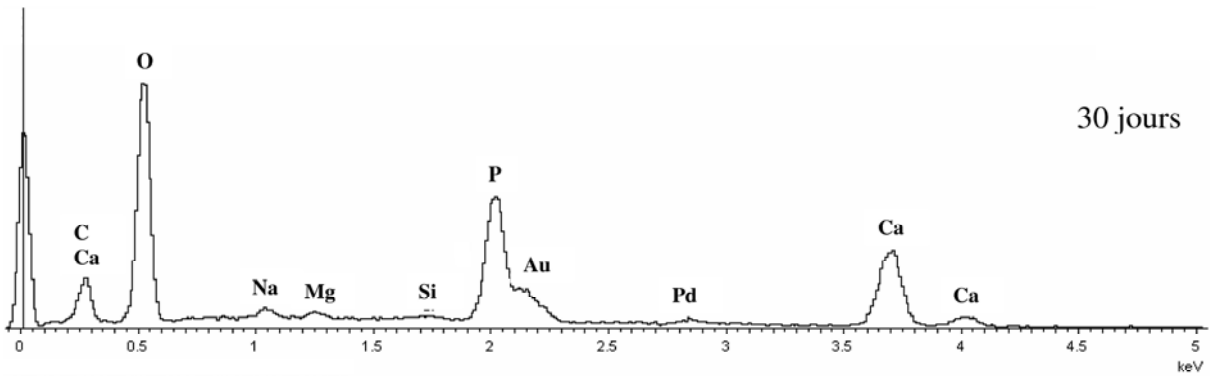
**Figure 10.4.** Spectres EDS de la surface du 46S6 Os après 1 et 24 heures d'immersion



**Figure 10.5.** Spectres EDS de la surface du 46S6 Os après 2 et 5 jours d'immersion



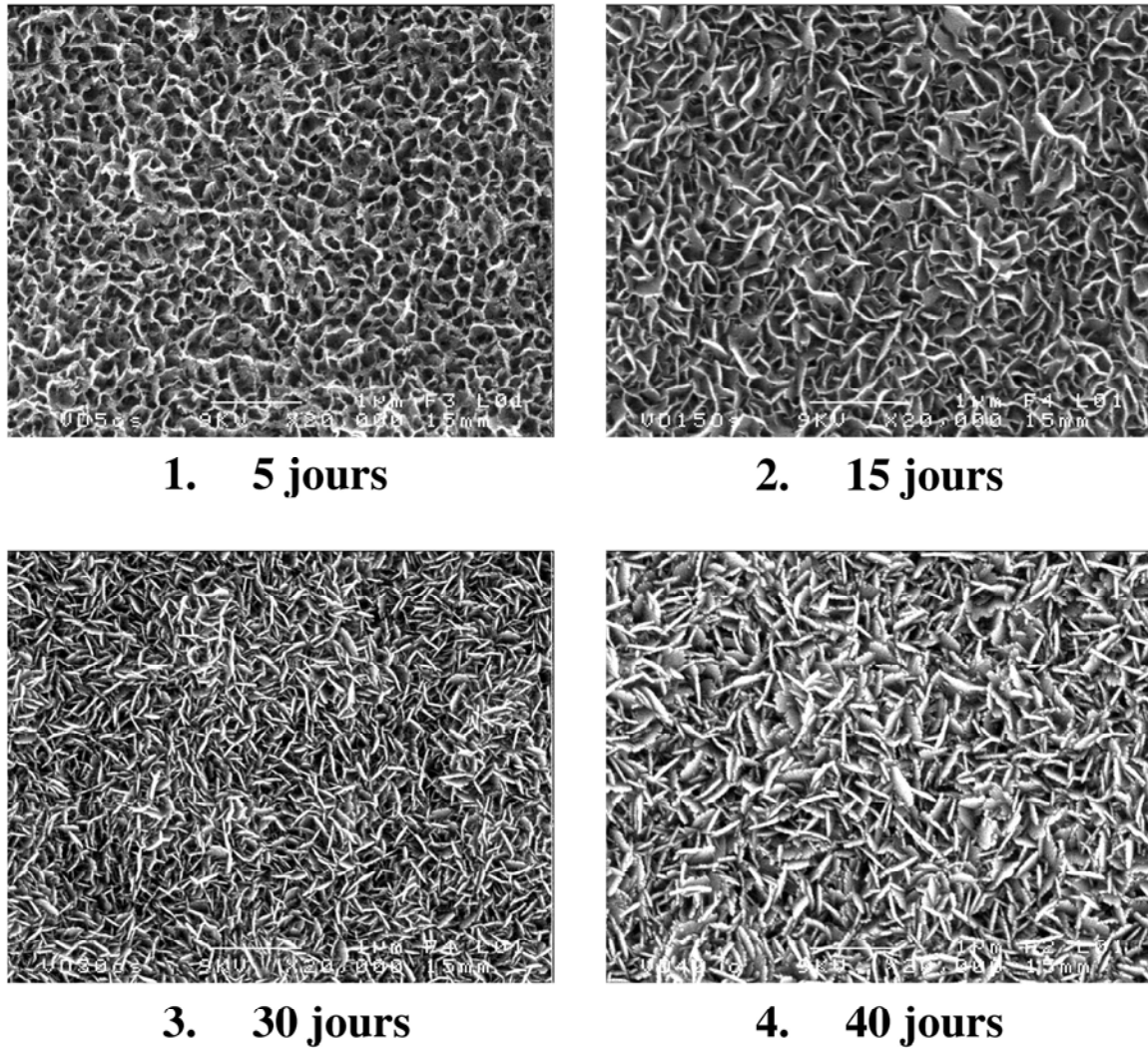
**Figure 10.6.** Spectres EDS de la surface du 46S6 Os après 15 jours d'immersion



**Figure 10.7.** Spectres EDS de la surface du 46S6 Os après 30 jours d'immersion

Sur la figure 10.3, les micrographies à partir de 5 jours d'immersion présentent une surface recouverte d'un dépôt de particules en formes d'aiguilles. L'analyse EDS confirme la formation d'hydroxyapatite à la surface du 46S6 Os avec la présence d'importantes quantités de calcium et de phosphore. Parallèlement, de moins en moins de silicium est détecté à la surface du verre lorsque les délais d'immersion augmentent, ce qui confirme la croissance de la couche d'hydroxyapatite. On remarque également la présence de magnésium sur l'ensemble des spectres EDS.

L'évolution de la morphologie de la couche d'hydroxyapatite entre 5 et 40 jours d'immersion est observable sur la figure 10.8. On constate la croissance et le développement des cristaux apatitiques à la surface du 46S6 Os. Ces derniers deviennent de mieux en mieux définis : leur taille et leur densité augmentent avec le temps d'immersion dans le SBF. Ainsi, la couche d'hydroxyapatite évolue de façon continue pendant les 40 premiers jours d'immersion.

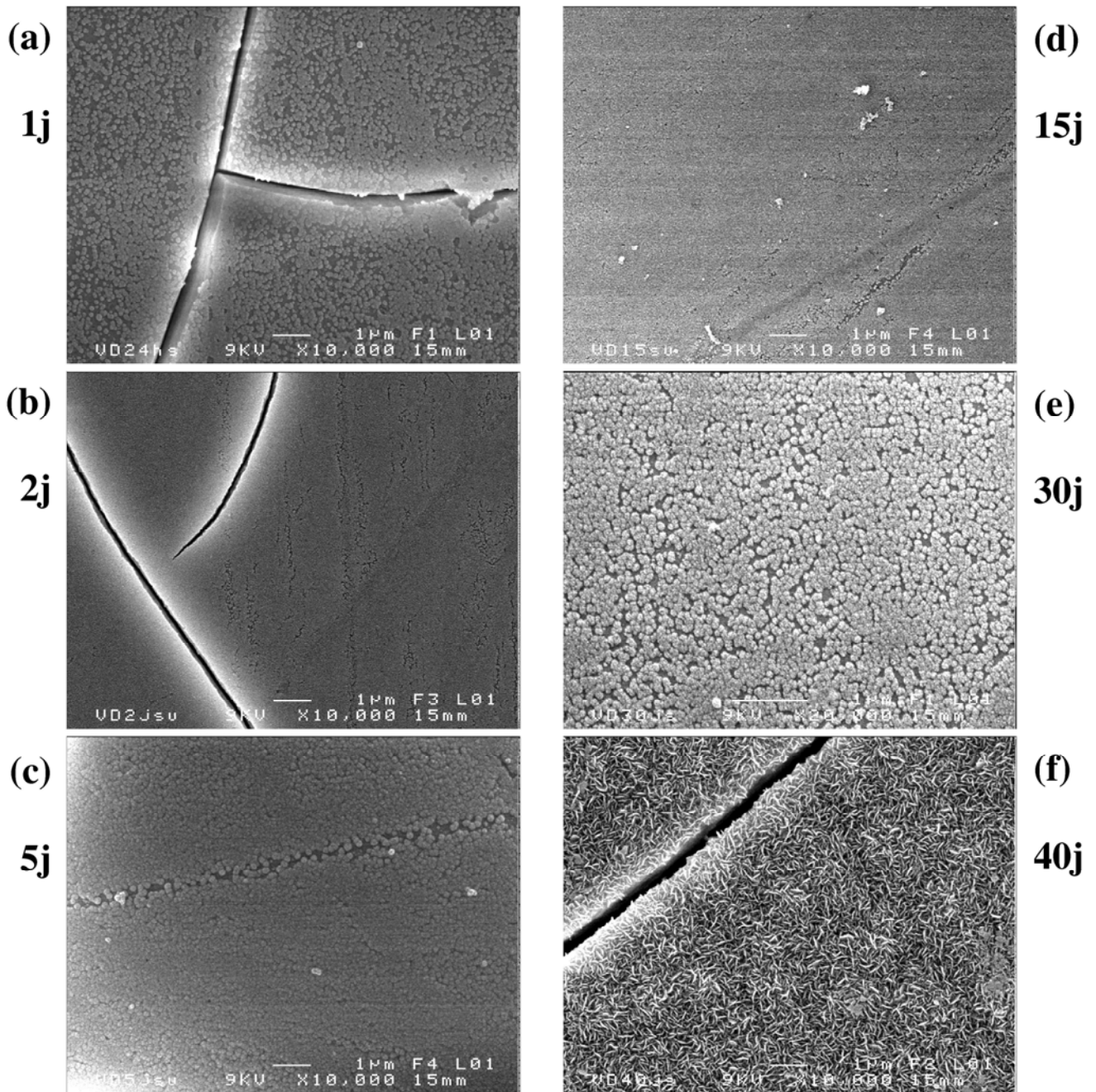


**Figure 10.8.** Surface du verre 46S6 Os ( $\times 20\,000$ ) après 5, 15, 30 et 40 jours d'immersion

La figure 10.9 présente les micrographies de la surface du 46S6 Sup après différents délais d'immersion dans le SBF. Chaque micrographie, au grossissement ( $\times 10\,000$ ), présente les différents délais d'immersion, compris entre 1 et 40 jours. Les analyses EDS associées aux micrographies sont présentées sur les figures 10.10, 10.11 et 10.12.

Entre 1 et 30 jours d'immersion, aucune cristallisation n'est observée à la surface du 46S6 Sup (figure 10.9) ; on observe la formation d'une couche en surface du verre grâce à la présence des craquelures. Cette dernière est constituée de petits amas sphériques, qui se lient entre eux jusqu'à formation d'une couche uniforme et homogène. Après 40 jours d'immersion, la couche en surface du 46S6 Sup est complètement cristallisée et présente la morphologie typique des cristaux d'hydroxyapatite.

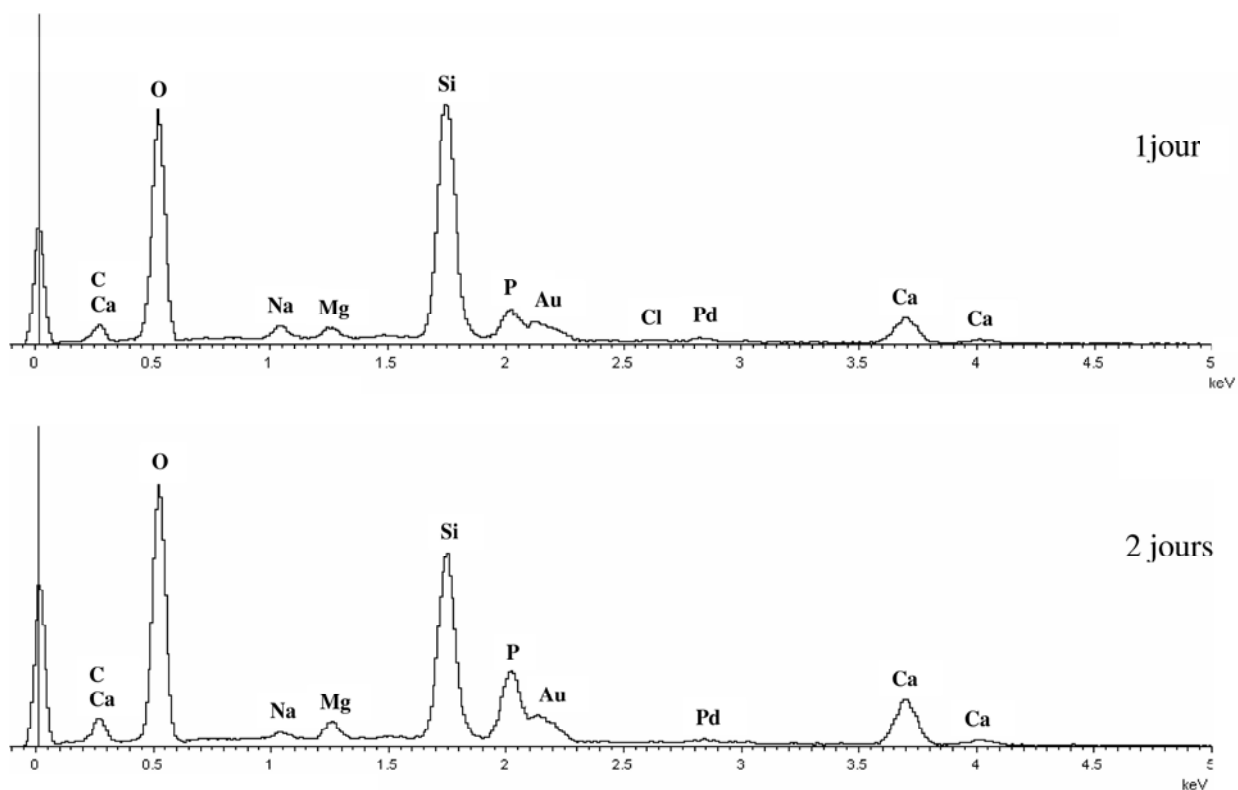




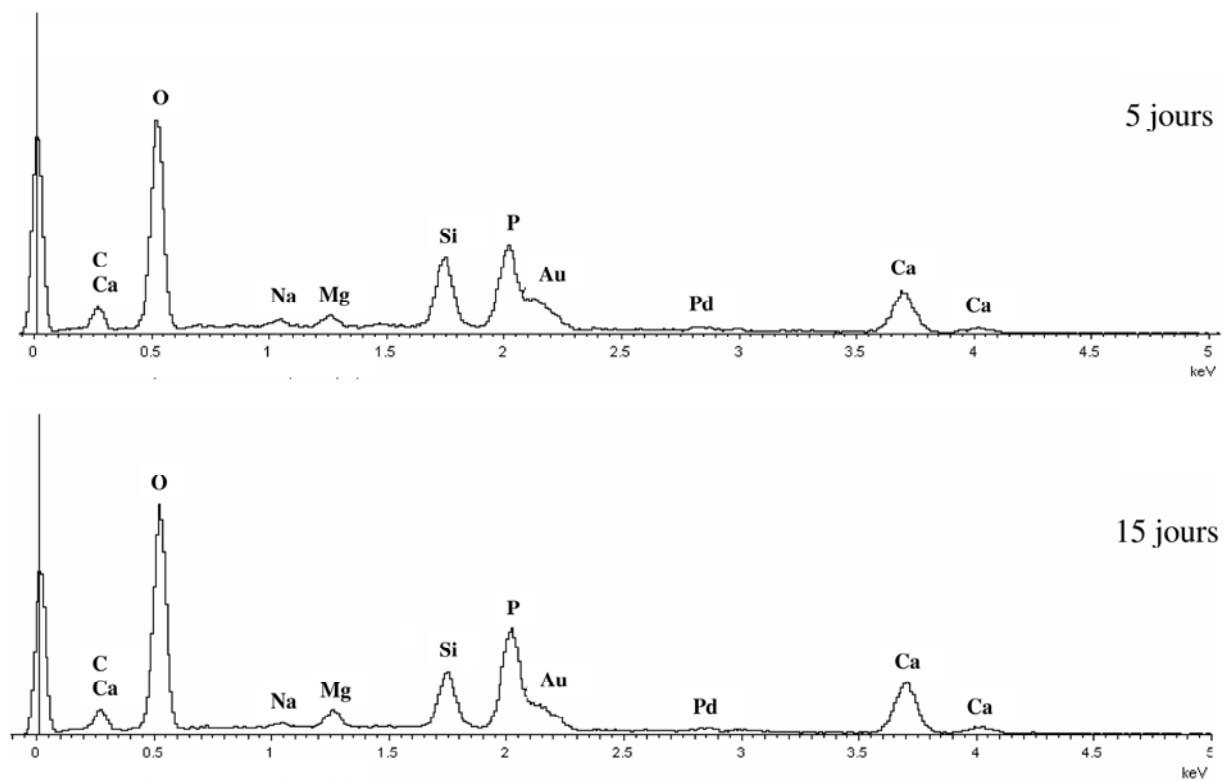
**Figure 10.9.** Surface du verre 46S6 Sup ( $\times 10\,000$ ) après différents délais d'immersion

Après 1 et 2 jours d'immersion, les analyses par EDS de la figure 10.10 indiquent la présence majoritaire de silicium et d'oxygène à la surface du 46S6 Sup. De la même manière que pour le 46S6 Os, la quantité de silicium détectée en surface diminue au profit des quantités de calcium et de phosphore lorsque les délais d'immersion augmentent. Après 15 et 30 jours d'immersion, le calcium et le phosphore deviennent les éléments présents majoritairement en surface, mais le silicium est toujours détecté en faibles quantités (figures 10.11 et 1.12).



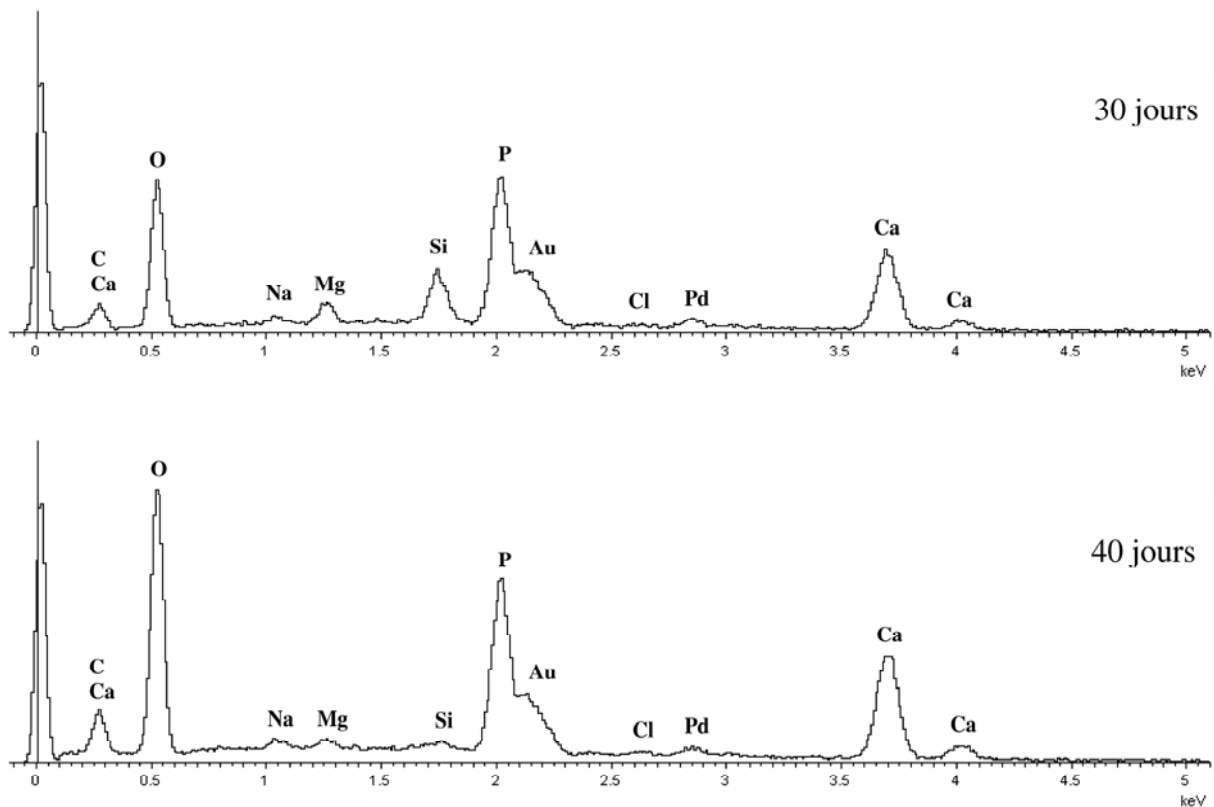


**Figure 10.10.** Spectres EDS de la surface du 46S6 Sup après 1 et 2 jours d'immersion



**Figure 10.11.** Spectres EDS de la surface du 46S6 Sup après 5 et 15 jours d'immersion

Après 15 et 30 jours d'immersion, le calcium et le phosphore sont les éléments présents majoritairement à la surface du 46S6 Sup. Cependant aucune cristallisation n'est observée en surface (figure 10.9) ; la couche formée en surface serait donc une couche de phosphate de calcium amorphe. Cette hypothèse est valable pour les échantillons après 15 jours d'immersion, mais elle est contredite par la diffraction des rayons X après 30 jours d'immersion.



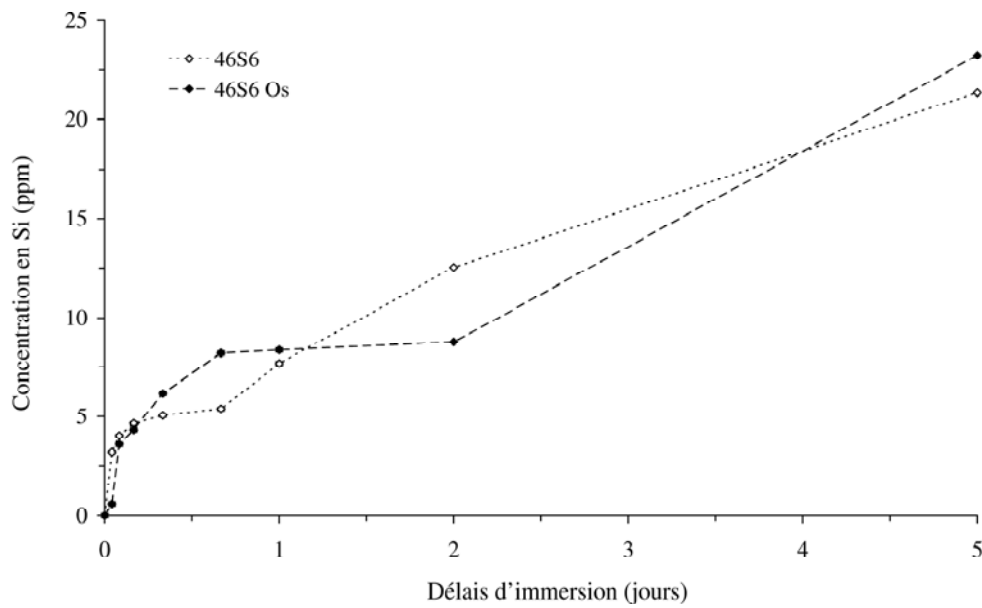
**Figure 10.12.** Spectres EDS de la surface du 46S6 Sup après 30 et 40 jours d'immersion

La couche formée à la surface du 46S6 Sup après 30 jours serait donc une forme de phosphate de calcium cristallisée, mais présentant une morphologie différente de celle observée après 40 jours d'immersion. Après 30 jours d'immersion, les cristallites sont de trop petite taille pour pouvoir être observés au MEB ; mais même si la phase tend à devenir très finement divisée, le domaine de diffraction cohérent est suffisamment grand pour pouvoir diffracter. Après 40 jours, on retrouve la morphologie typique des cristaux d'hydroxyapatite, en accord avec les analyses par EDS et la diffraction des rayons X de cette même surface.

## 2. Effets des éléments dopants sur la composition du SBF lors des tests *in vitro*

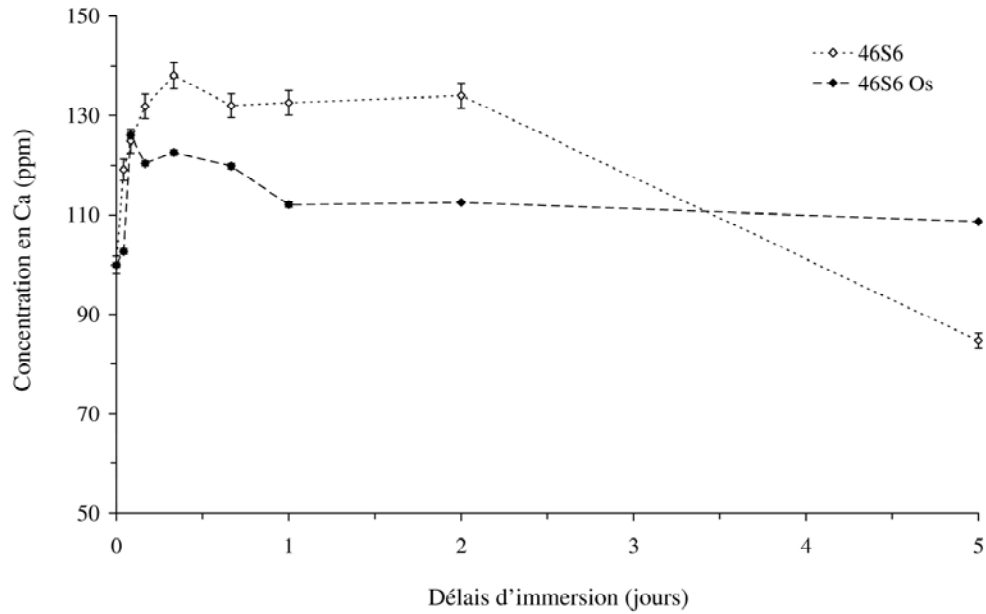
### 2.1. Immersion des échantillons de verre 46S6 Os

L'évolution de la composition du SBF en fonction du temps d'immersion des échantillons de 46S6 et 46S6 Os est présentée sur les figures 10.13, 10.14 et 10.15. Les résultats montrent qu'aucun relargage en zinc et en strontium n'a été observé pour le 46S6 Os.



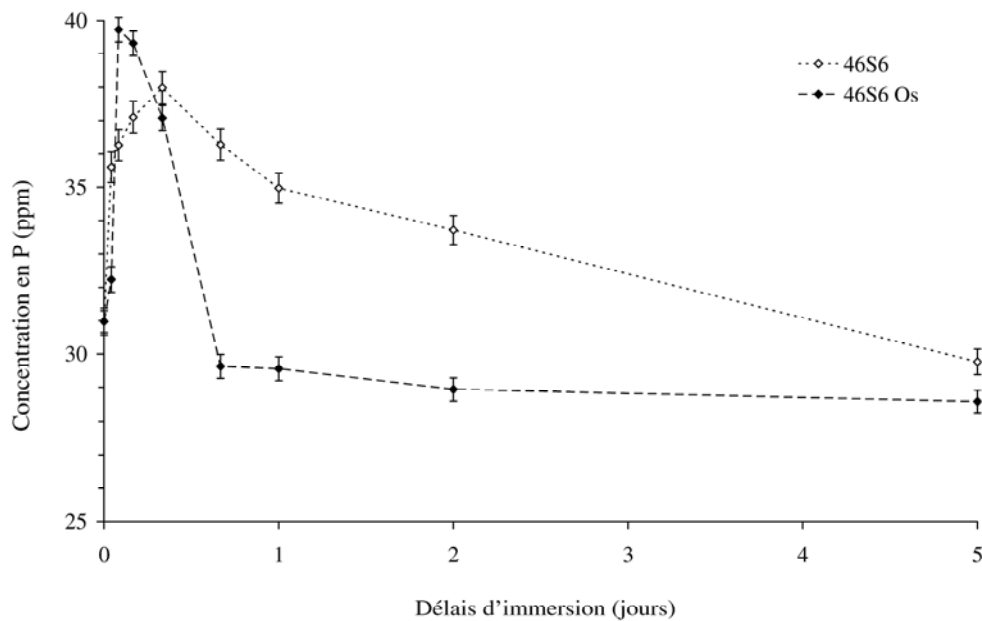
**Figure 10.13.** Concentration en Si dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Pour le verre 46S6 Os, la concentration en silicium dans le SBF augmente progressivement pendant les 16 premières heures d'immersion. Entre 16 heures et 2 jours, cette dernière demeure constante, puis le relargage de silicium reprend jusqu'à atteindre environ 23 ppm à l'issue des 5 jours d'immersion. La cinétique de relargage du silicium observée pour le 46S6 Os est très voisine de celle du verre de référence 46S6. La figure 10.14 montre que le calcium est relargué en quantité moins importante pour le 46S6 Os et l'évolution de sa concentration ne présente que de faibles variations. En effet, le relargage de calcium n'a lieu que pendant les 2 premières heures d'immersion. Entre 2 et 24 heures, la concentration en calcium décroît et se stabilise à environ 110 ppm. La teneur en calcium dans le SBF reste quasiment constante entre 2 et 5 jours d'immersion.



**Figure 10.14.** Concentration en Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion

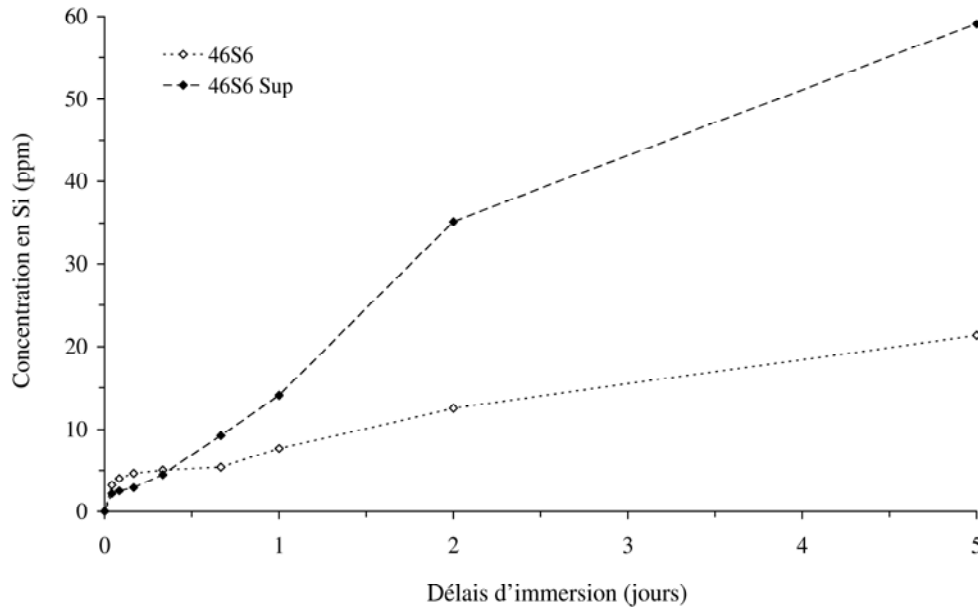
Pour le 46S6 Os, la concentration en phosphore augmente fortement pendant les 2 premières heures d'immersion, jusqu'à atteindre environ 39 ppm, puis diminue tout aussi rapidement entre 2 et 16 heures d'immersion (figure 10.15). Enfin, entre 16 heures et 5 jours, la teneur en phosphore dans le SBF se stabilise autour de 29 ppm. La réactivité chimique du 46S6 Os est donc très différente de celle observée pour le 46S6, en ce qui concerne l'évolution de la concentration en phosphore.



**Figure 10.15.** Concentration en P dans le SBF en fonction du temps d'immersion

## 2.2. Immersion des échantillons de verre 46S6 Sup

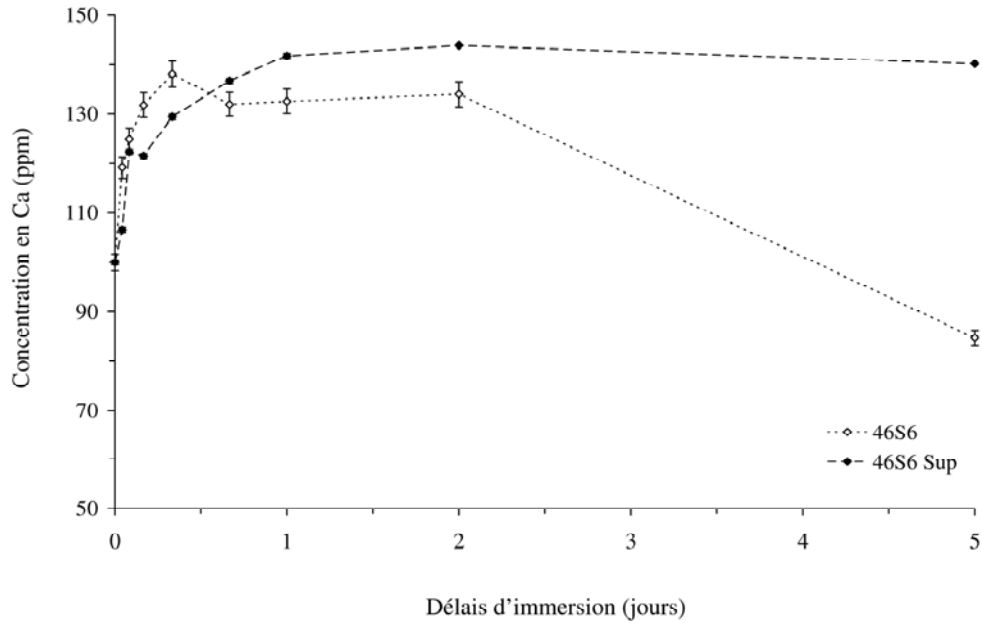
L'évolution de la composition du SBF en fonction du temps d'immersion des échantillons de 46S6 et 46S6 Sup est présentée sur les figures 10.16, 10.17 et 10.18.



**Figure 10.16.** Concentration en Si dans le SBF en fonction du temps d'immersion

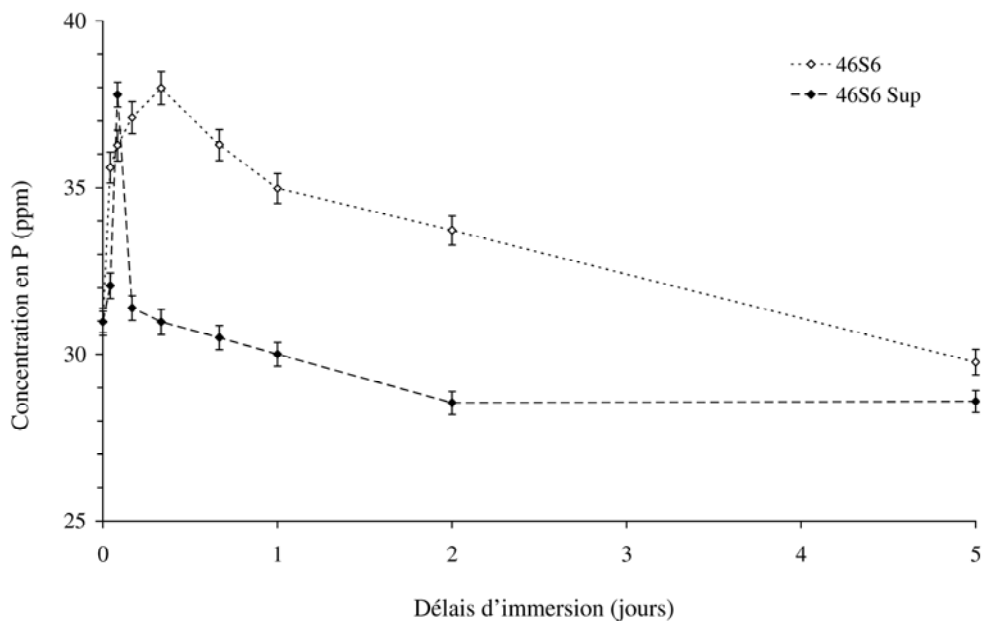
Pour le verre 46S6 Sup, la concentration en silicium dans le SBF est croissante jusqu'à 5 jours d'immersion. A partir de 16 heures, cette dernière est supérieure pour le verre dopé que pour le verre pur et l'écart entre les concentrations en silicium des deux compositions augmente avec le temps d'immersion.

La figure 10.17 montre que la concentration en calcium dans le SBF croît jusqu'à 1 jour d'immersion pour le verre 46S6 Sup ; après 1 jour, cette dernière demeure quasiment constante à environ 141 ppm. A l'inverse pour le verre de référence 46S6, la concentration en calcium diminue fortement après 2 jours d'immersion.



**Figure 10.17.** Concentration en Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Les variations de la concentration en phosphore observées pour le 46S6 Sup sont très proches de celles du 46S6 Os. Le relargage de phosphore a lieu pendant les 4 premières heures d'immersion, puis on observe une forte diminution de sa concentration entre 4 et 8 heures. Cette dernière continue de diminuer entre 8 heures et 2 jours, puis tend à se stabiliser entre 2 et 5 jours d'immersion.



**Figure 10.18.** Concentration en P dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Enfin, un très faible relargage en strontium (inférieur à 1 ppm) a été observé pour le 46S6 Sup après 2 et 5 jours d'immersion.

### **3. Résumé des observations pour les verres dopés avec trois éléments simultanément**

Concernant le verre 46S6 Os, le relargage en silicium et de ce fait, la dissolution de la matrice vitreuse, est peu affecté par la présence des trois dopants simultanément. En revanche, les évolutions des concentrations en calcium et phosphore présentent des profils originaux : les éléments relargués au tout début de l'immersion sont rapidement consommés. A partir de 16 heures d'immersion, les concentrations en calcium et phosphore restent constantes. La consommation rapide de ces éléments présents dans le SBF met ainsi en relief une formation précoce et un développement rapide de la couche d'hydroxyapatite en surface, confirmés par les observations au MEB. En effet, dès 5 jours, la surface des échantillons est complètement cristallisée et la couche d'hydroxyapatite continue à croître et se densifier jusqu'à 40 jours d'immersion.

A l'inverse, les éléments dopants introduits dans la matrice du 46S6 Sup favorisent la dissolution de la matrice vitreuse, notamment à partir de 1 jour d'immersion dans le SBF, comme en témoignent les concentrations en silicium relargué. La quantité de calcium relargué est également supérieure à celle observée pour le 46S6 et reste constante après 1 jour d'immersion. Cependant, la couche riche en calcium et phosphore se forme dès un jour d'immersion et le phosphore présent dans le SBF est rapidement consommé durant cette période. Comme pour le 46S6Mg120, les quantités de calcium et de phosphore à la surface du 46S6 Sup deviennent prédominantes à partir de 5 jours d'immersion, mais la cristallisation en hydroxyapatite n'est observée qu'après 40 jours d'immersion.

## Chapitre 11

### Discussion sur les interactions verres bioactifs - SBF

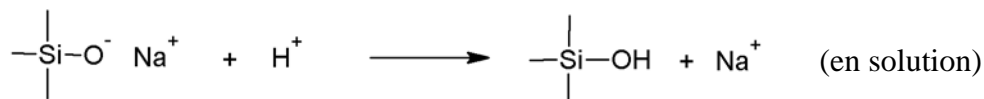
Nous avons mis en évidence, dans les chapitres précédents, la bioactivité de l'ensemble des verres étudiés. Lors des expérimentations *in vitro* en l'absence de cellules, les verres réagissent avec le milieu environnant et forment à leur surface une couche de phosphate de calcium, identifiée comme de l'hydroxyapatite carbonatée contenant du magnésium à l'état de trace. Dans ce chapitre, nous nous attacherons dans un premier temps à exposer le processus de bioactivité de façon détaillée, en nous basant sur les observations réalisées lors de l'étude du verre pur 46S6 (Chapitre 6). Dans un second temps, nous analyserons l'influence des éléments dopants introduits dans la matrice vitreuse, en comparant et en interprétant les différences observées sur la réactivité et la bioactivité des verres après immersion dans le SBF (Chapitres 7, 8, 9 et 10).

#### 1. Bilan des interactions à l'interface verre bioactif - SBF

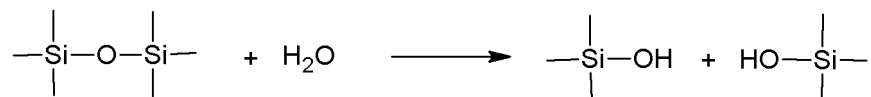
Les réactions physico-chimiques se produisant en surface lors des tests *in vitro* suivent un mécanisme commun à l'ensemble des verres bioactifs étudiés [101]. En revanche, la cinétique de ce mécanisme est fortement influencée par la composition des verres, notamment selon leurs teneurs en alcalins et alcalino-terreux [102-104]; ainsi de nombreuses variations de comportement ont été observées lors de l'introduction d'éléments dopants, tel que le magnésium [109-111].

D'une manière générale, les réactions physico-chimiques s'opérant à la surface des verres bioactifs ont pu être décomposées en cinq étapes [3]. La première étape est la désalcalinisation de la surface ; elle consiste au relargage des ions modificateurs de réseau présents dans la matrice du verre. Il s'agit en général d'ions alcalins et alcalino-terreux faiblement liés au réseau vitreux. Dans le cas du 46S6, il s'agit des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  présents à la surface du verre, qui sont alors échangés rapidement avec les ions  $\text{H}^+$  présents dans le SBF selon la réaction :

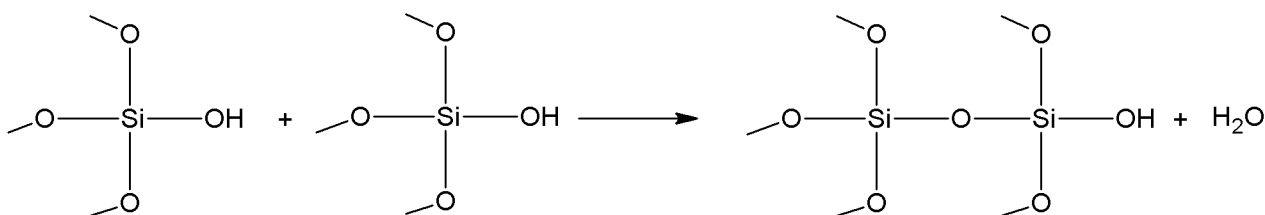




La deuxième étape correspond à l'hydrolyse du réseau vitreux. Sous l'action du SBF, les liaisons Si-O-Si du réseau se rompent en surface du verre ; de ce fait, des groupements solubles Si(OH)<sub>4</sub> sont relargués dans le milieu et dans le même temps, des groupements silanols Si-OH se forment à la surface du verre, selon la réaction :

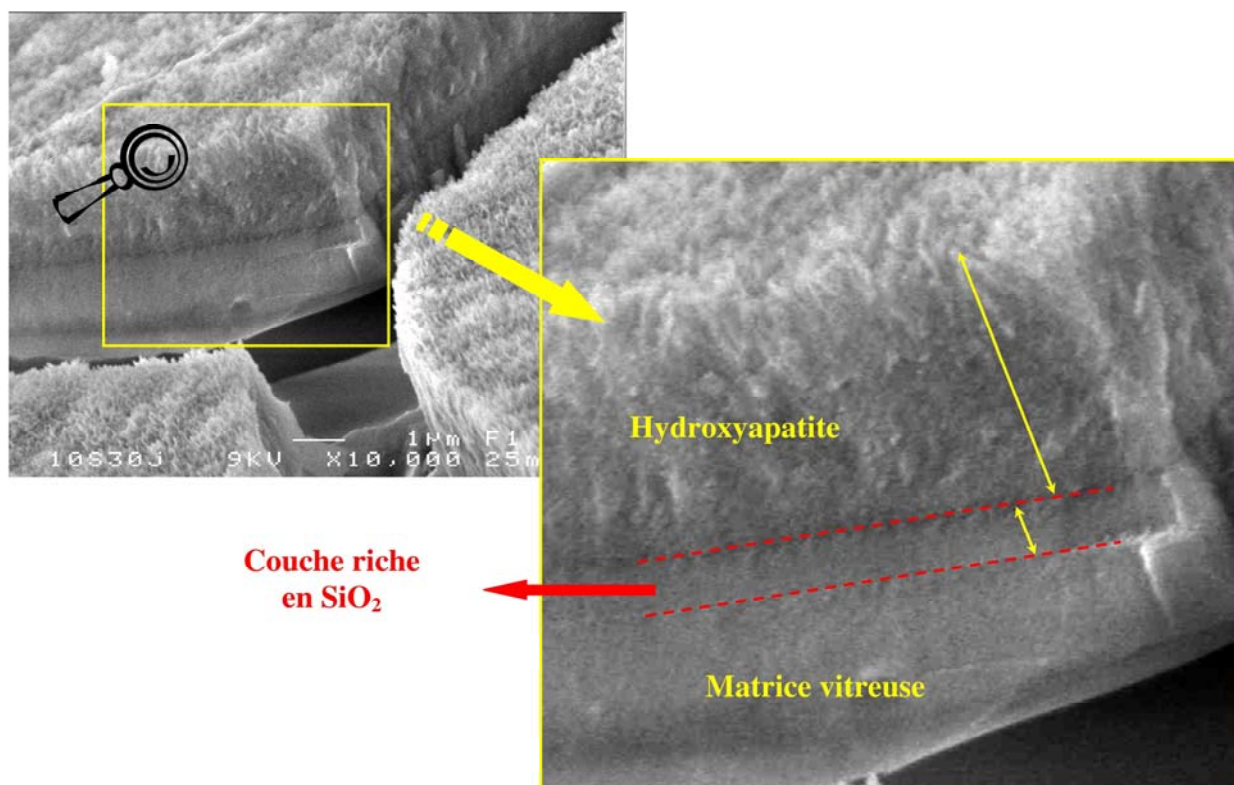


Puis, lors de la troisième étape, les groupements silanols formés à la surface du verre se condensent et repolymérisent entre eux pour former une couche de gel hydraté riche en silicium et appauvrie en cations alcalins et alcalino-terreux.



Cette couche riche en SiO<sub>2</sub> permet alors le développement d'une couche de phosphate de calcium, lors de la quatrième étape. En effet, des précipités amorphes de phosphate de calcium vont croître à la surface de cette dernière, d'une part grâce à la migration des ions Ca<sup>2+</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> présents dans la matrice du verre et d'autre part grâce à l'incorporation du calcium et des phosphates solubles présents dans le SBF. A l'issue de cette étape, une couche de phosphate de calcium amorphe recouvre la surface des verres bioactifs. La cinquième et dernière étape correspond à la cristallisation de la couche amorphe de phosphate de calcium, par incorporation des ions OH<sup>-</sup> et Mg<sup>2+</sup>, ainsi que des carbonates CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> présents dans le milieu. La couche obtenue à l'issue de cette étape est une couche d'hydroxyapatite carbonatée, proche de la phase minérale de l'os.

La figure 11.1 présente le détail des différentes couches développées à la surface du 46S6 lors de l'immersion ; la superposition de la couche riche en SiO<sub>2</sub> et de la couche d'hydroxyapatite est clairement observable au-dessus de la matrice du verre.



**Figure 11.1.** Micrographies de la surface du 46S6 après 30 jours d'immersion.  
Détails des différentes couches développées en surface lors des tests *in vitro*.

Les analyses du SBF par ICP-OES après immersion des échantillons de 46S6 confirment également les différentes étapes du processus de bioactivité. En effet, les ions alcalins et alcalino-terreux (sodium et calcium pour le 46S6) sont relargués très rapidement du verre vers le SBF durant les huit premières heures d'immersion (figure 6.10), ce qui correspond à l'étape 1. Simultanément, l'étape 2 a lieu avec le relargage de silicium sous forme de groupements solubles  $\text{Si}(\text{OH})_4$  (figure 6.9). Pendant l'étape 4, une partie du calcium et du phosphore relargués par le verre est utilisée pour former la couche de phosphate de calcium amorphe. En effet sur les figures 6.10 et 6.11, les concentrations en calcium et phosphore diminuent ; ces derniers ne sont pas présents en quantité suffisante à la surface du verre 46S6 pour maintenir la croissance et la cristallisation de la couche de phosphate de calcium, lors des étapes 4 et 5.

Les diffractogrammes et spectres IR obtenus après 30 jours d'immersion (figure 6.1 et 6.3) confirment enfin la présence d'hydroxyapatite mal cristallisée à la surface du verre 46S6 (étape 5).

## **2. Influence du magnésium sur les interactions verres bioactifs - SBF**

Le verre dopé au magnésium réagit plus rapidement que le 46S6 en ce qui concerne la dissolution de la matrice vitreuse et la formation de la couche riche en calcium et en phosphore.

Les différents verres bioactifs étudiés présentent une réactivité chimique importante en milieu aqueux. Dans la matrice vitreuse, le magnésium est introduit sous forme d'oxyde de magnésium. D'une manière générale, les oxydes alcalins ont un rôle de fondant lors de la synthèse des verres : leur introduction provoque la rupture de liaisons Si-O-Si et par conséquent l'apparition d'un oxygène non pontant. Ceci a pour effet de fragiliser le réseau et d'augmenter la solubilité de la matrice vitreuse [105]. Les analyses par ICP-OES confirment le fait que l'introduction de magnésium augmente la solubilité du réseau de silice et en particulier le relargage de silicium dans le SBF. En effet, la quantité de silicium relarguée est environ deux fois plus importante dans le cas du verre dopé magnésium 46S6Mg120 que dans la cas du verre pur 46S6, et ce quel que soit le temps d'immersion.

Cet important relargage à l'interface de verre dopé au magnésium et du SBF a pour effet d'augmenter l'épaisseur du gel vitreux de silice qui se forme en surface [106]. Ainsi, plus la concentration en magnésium augmente, plus le gel vitreux de silice devient épais. De plus, ce gel présente une surface spécifique importante [107], ce qui permet d'accélérer le processus de dissolution. L'observation de la morphologie des craquelures (apparues lors du séchage des échantillons) à la surface du 46S6 et 46S6Mg120 confirme cette tendance (figure 7.3). Plus le temps d'immersion augmente et plus les craquelures deviennent larges et régulières ; cependant, à temps d'immersion équivalent, c'est le verre dopé au magnésium qui présente les craquelures les plus régulières et les plus larges. Ainsi, l'évolution de la morphologie des craquelures peut être directement corrélée à l'augmentation de l'épaisseur du gel vitreux de silice. La vitesse de dissolution et l'épaisseur du gel vitreux de silice formé en surface dépendent donc de la composition du verre et notamment de la présence d'éléments dopants comme le magnésium.

D'après les analyses réalisées par EDS effectuées à la surface des échantillons, la formation de la couche de phosphate débute dès le premier jour d'immersion pour le verre dopé au magnésium, avec une forte utilisation du calcium et du phosphore présents dans le SBF (figure 7.4).

A partir de 5 jours d'immersion, ces derniers sont les éléments majoritairement présents à la surface du verre dopé en magnésium (figure 7.5). Cependant, même si la couche de phosphate de calcium est formée plus rapidement à la surface du 46S6Mg120 qu'à la surface du verre pur 46S6, cette dernière évolue plus difficilement en phase cristallisée.

La transformation de la couche phosphocalcique en apatite est progressive : elle implique notamment la formation de phases métastables de phosphates de calcium. De plus, cette transformation s'effectue sur des sites particuliers de nucléation, donnant lieu à la formation de petits cristaux d'apatite de taille typiquement comprise entre 200 et 600 nm [108]. Le magnésium est détecté à la surface des verres lors des tests *in vitro*, mais en quantité plus importante à la surface du 46S6Mg120. En effet, dans le cas du 46S6Mg120, le magnésium détecté provient non seulement des ions  $Mg^{2+}$  présents dans le SBF mais également du magnésium entrant dans la composition du verre. Cet élément, naturellement présent dans les apatites naturelles, est connu pour ses effets inhibiteurs quant à la cristallisation des apatites, en favorisant la formation de phosphates de calcium amorphes [109-110].

L'introduction de magnésium dans la matrice du verre diminue donc la cristallinité de l'hydroxyapatite à la surface des verres, et à partir d'une certaine teneur la couche phosphocalcique demeure amorphe. Lors de notre étude, cette teneur limite se situe à environ 1% en masse de magnésium dans la matrice vitreuse. En effet, pour des teneurs supérieures ou égales à cette limite, une cristallinité très faible est constatée à la surface des verres, quelle que soit la méthode de caractérisation utilisée. Ce phénomène s'explique par une diminution de la taille des cristallites. La phase tend à devenir très finement divisée et les domaines de diffraction cohérents deviennent plus petits ; on perd alors l'ordre à grande distance.

Ainsi, la plus grande solubilité de la matrice vitreuse et la non-cristallisation de l'hydroxyapatite en surface peuvent être corrélées à la présence en magnésium dans la composition des verres bioactifs. L'intensité de ces effets dépend de la teneur en magnésium introduite dans la matrice vitreuse. Les résultats obtenus montrent que la formation de phosphates de calcium amorphes et l'absence de cristallisation de ces phases a lieu à la surface de verre contenant au moins 1% de magnésium [111].

### 3. Influence du zinc sur les interactions verres bioactifs - SBF

Les verres dopés au zinc présentent une dissolution et un relargage des ions calcium et phosphore de la matrice vitreuse retardés comparativement au verre pur 46S6. En effet, l'analyse de la composition du SBF indique que de plus faibles quantités de calcium, de phosphore et de silicium sont relarguées par les verres dopés au zinc lors des premières heures d'immersion ; en particulier, aucune trace de silicium n'a été détectée après une heure d'immersion.

L'introduction de zinc dans la matrice vitreuse a donc pour effet de ralentir la dissolution de la matrice vitreuse. Le ralentissement de l'étape de désalcalinisation de la surface du verre retarde alors l'hydrolyse du réseau vitreux et la formation des groupements silanols Si-OH à l'interface verre bioactif – SBF. Les verres dopés au zinc présentent ainsi une meilleure stabilité chimique. D'après la littérature, dans le cas de verres de phosphosilicate, le zinc est en position de formateur de réseau et adopte une coordination tétraédrique. Il copolymérise avec les atomes de silicium tétraédrique et provoque ainsi une complexation du réseau [112]. Un comportement similaire a été observé dans des verres de vitrage classiques [113] et serait responsable de l'amélioration de la stabilité chimique des verres. L'introduction de zinc provoque une diminution globale du relargage ionique [114]. Ces phénomènes, observés pour des teneurs en oxyde de zinc comprises entre 1 et 10% en masse, ont par la suite été confrontés aux résultats obtenus par RMN du solide, afin de mieux comprendre l'influence du zinc dans la structure du réseau vitreux de nos échantillons (cf Chapitre 12).

L'étude par spectroscopie infrarouge de la surface des verres, et plus particulièrement l'assignation des bandes, permet d'expliquer en partie la réactivité des verres bioactifs étudiés. Les bandes Si-O-Si situées à 470 et 795  $\text{cm}^{-1}$  sont en lien direct avec la quantité de silicium présente dans la couche formée à la surface des verres. La bande à 795  $\text{cm}^{-1}$  témoigne en particulier de la formation de la couche de gel vitreux de silice. Avec l'augmentation de la teneur en zinc dans la matrice vitreuse, l'intensité de cette dernière diminue fortement, jusqu'à disparaître. La bande à 470  $\text{cm}^{-1}$  est également affectée et voit son intensité largement diminuer (figure 8.2). Ces observations sont en accord avec les analyses effectuées par ICP des différentes solutions de SBF.

En effet, si la formation et le relargage des groupements silanols sont ralentis, voire inhibée, alors la formation de la couche riche en  $\text{SiO}_2$  le sera également. Ce ralentissement de la formation du gel vitreux de silice est mis en évidence lors de l'analyse par spectroscopie infrarouge. Les verres dopés au zinc présentent une plus faible dissolution de leur matrice vitreuse, ce qui génère une formation moins importante de gel vitreux riche en  $\text{SiO}_2$  à leur surface. Les résultats obtenus montrent également que l'introduction de zinc dans la matrice vitreuse induit des modifications sur la cinétique de formation, ainsi que sur la cristallisation (morphologie et taille des cristaux) de la couche d'hydroxyapatite lors des tests *in vitro*. Concernant la cinétique de formation de la couche phosphocalcique, les analyses par EDS de la surface du 46S6Zn10 nous indiquent que cette dernière est présente à partir de 2 jours d'immersion et devient majoritaire à 5 jours (figure 8.5). La formation de cette couche se fait plus tardivement à la surface du 46S6, puisque cette dernière est observable seulement à partir de 5 jours et majoritaire à partir de 15 jours d'immersion (figure 6.7). L'introduction de zinc favorise donc un développement plus rapide de la couche phosphocalcique à la surface des verres bioactifs.

L'étape de cristallisation des phosphates de calcium est également modifiée en présence de zinc dans la matrice vitreuse. En effet, après 30 jours d'immersion, les diagrammes de diffraction des rayons X présentent un élargissement des raies obtenues ainsi qu'une diminution globale de la cristallinité à la surface des verres (figure 8.1). Ces modifications sont caractéristiques d'un développement et d'une précipitation moindres de la couche d'hydroxyapatite. Or, d'après les analyses IR, les phosphates sont en phase cristalline avec la présence des bandes P-O à 565 et 603  $\text{cm}^{-1}$ . Ces deux remarques complémentaires peuvent s'expliquer par une diminution globale de la taille des cristaux d'hydroxyapatite, confirmée lors de l'observation au MEB de la surface des échantillons, lors de l'introduction de zinc dans la matrice vitreuse.

La présence de zinc dans la composition des verres engendre donc une meilleure stabilité chimique de la matrice vitreuse, avec un relargage ionique globalement diminué, et a pour conséquence un ralentissement de la formation de la couche riche en  $\text{SiO}_2$ . La couche d'hydroxyapatite présente une bonne qualité de cristallisation, mais la taille des cristaux formés diminue avec l'introduction de zinc. De la même manière que pour les verres dopés au magnésium, l'intensité de ces effets dépend de la teneur en zinc introduite dans la matrice vitreuse [115].

#### 4. Influence du strontium sur les interactions verres bioactifs – SBF

Les analyses effectuées par ICP-OES ont montré que l'introduction de strontium dans la matrice vitreuse inhibe le relargage du silicium pendant les premières 24 heures d'immersion (figure 9.9). Par la suite, la quantité de silicium relarguée dans le SBF est fortement diminuée par rapport au 46S6, ce qui est caractéristique d'un ralentissement de la dissolution de la matrice vitreuse. Le strontium est connu pour se substituer au calcium dans les compositions de verre. Il possède cependant un rayon ionique plus large que celui calcium (1,13Å contre 1,00 Å) ; le strontium occupe ainsi plus d'espace dans la maille cristalline et diminue le mouvement des atomes de silicium, ce qui expliquerait le ralentissement de la dissolution de la matrice vitreuse (teneur de 1 à 5% en masse de SrO) [108]. Cependant, dans notre étude, la teneur maximum de strontium introduite dans la matrice du verre est de 0,1%. Une faible proportion de strontium peut ainsi modifier fortement la cinétique de réaction des verres lors des tests *in vitro* [116]. Des études complémentaires par RMN du solide ont alors été entreprises afin de mieux comprendre l'origine des différences de comportement observées entre les verres synthétisés (cf Chapitre 12).

De la même manière que pour les verres dopés au zinc, un ralentissement de la dissolution de la matrice vitreuse implique un ralentissement, voire une inhibition de la formation des groupements silanols à la surface du verre dopé au strontium. Cette réaction en chaîne aboutit finalement à une formation moins importante de la couche riche en SiO<sub>2</sub>. Cette influence du strontium sur le gel vitreux de silice est confirmée par les modifications observées sur les bandes Si-O-Si à 795 et 470 cm<sup>-1</sup>, caractéristiques de la formation de cette couche à la surface des verres (figure 9.2).

Dans la littérature, plusieurs études ont montré un effet variable du strontium selon la teneur introduite dans la composition de différents biomatériaux. Cette variabilité de l'effet du strontium affecte notamment aussi bien la différenciation cellulaire [117] que la formation de l'hydroxyapatite (réduction de la taille des cristaux) [118-119]. De plus, la solubilité de l'hydroxyapatite augmente avec la teneur en strontium [120]. Lors de notre étude, nous avons également observé la variabilité de l'effet du strontium lors des tests *in vitro*, sur la formation et la cristallisation de la couche d'hydroxyapatite à la surface des verres. En effet, seul le verre 46S6Sr10 présente une surface cristallisée après 30 jours d'immersion dans le SBF.

L'étude par diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge de la surface des verres après 30 jours d'immersion confirment ces deux comportements distincts. Pour des teneurs en strontium comprises entre 0,02 et 0,08% en masse, la bande IR à  $565\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique des phosphates en phase cristalline, tend à disparaître (figure 9.2) ; pour ces mêmes teneurs, on observe par DRX un élargissement du groupe de raies à environ  $32^\circ(2\theta)$ , ainsi que la disparition de la raie à  $26^\circ(2\theta)$  (figure 9.1). Cependant, une couche de phosphate de calcium est bien présente à la surface de ces verres après 30 jours d'immersion (figure 9.8). A l'inverse, le verre 46S6Sr10 présente une surface parfaitement cristallisée après 30 jours d'immersion (figure 9.3 (h)).

Ces observations suggèrent que la présence de strontium, pour des teneurs inférieures à 0,1% en masse, influence la formation de la couche d'hydroxyapatite, et notamment sa cinétique de cristallisation à la surface des verres. Deux hypothèses peuvent alors être émises : soit le strontium introduit à faible teneur diminue fortement la cristallinité de la couche de phosphate de calcium qui est présente à la surface des verres, soit il modifie la structure de l'hydroxyapatite, en formant des cristaux d'hydroxyapatite de taille nanométrique. Concernant la cinétique de formation de la couche phosphocalcique à la surface du 46S6Sr10, les analyses réalisées par EDS indiquent que la présence de calcium et de phosphore devient majoritaire à 5 jours d'immersion (figure 9.5) ; ce phénomène n'est observé qu'après 15 jours d'immersion à la surface du 46S6 (figure 6.7). L'analyse par ICP-OES confirme cette tendance ; en effet, la concentration en calcium dans le SBF décroît plus rapidement pour le verre dopé au strontium que pour le verre pur (figure 9.10). Le calcium est donc incorporé plus rapidement à la surface 46S6Sr10 pour former la couche de phosphate de calcium, mais aucune modification de la cristallisation de cette couche n'est observée.

De la même manière que le zinc, la présence de strontium dans la matrice des verres engendre une meilleure stabilité chimique du réseau vitreux. Le relargage de silicium est très diminué, ce qui induit un ralentissement de la formation de la couche riche en  $\text{SiO}_2$ . Concernant la formation de la couche d'hydroxyapatite, deux tendances sont observées : le verre dopé à 0,1% en masse de strontium présente une qualité de cristallisation similaire à celle du 46S6 ; à l'inverse d'importants changements ont lieu pour les verres dopés avec des teneurs inférieures à 0,1% en masse de strontium. De la même manière que pour les verres dopés au magnésium et au zinc, l'intensité des effets observés dépend de la teneur en strontium introduite dans la matrice vitreuse. Cependant, les effets induits par le strontium semblent plus complexes, car leur intensité n'est pas proportionnelle à la teneur introduite [121].



## 5. Influence des 3 éléments introduits simultanément sur les interactions verres bioactifs – SBF

L'introduction de trois éléments dopants simultanément dans la matrice vitreuse modifie de façon importante la réactivité chimique du matériau, que ce soit par rapport au verre de référence 46S6 ou par rapport à l'influence des éléments dopants introduits séparément. En effet, en fonction des teneurs introduites en éléments, de nombreuses différences de comportement ont été observées entre les 46S6 Os et le 46S6 Sup.

Concernant le verre 46S6 Os, la dissolution de la matrice vitreuse est peu affectée par la présence des trois dopants simultanément, comparativement au verre 46S6. L'introduction de magnésium, de zinc et de strontium, respectivement à 0,5 %, 0,03 % et 0,03 % en masse, équilibre ainsi les effets observés lors de l'ajout de ces dopants séparément. En effet, la présence de magnésium (à 1,2 % en masse) augmente le relargage de silicium dans le SBF, alors que la présence de zinc et de strontium (à 0,1 % en masse) le ralentit. Le calcium et le phosphore sont quant à eux relargués pendant les 2 premières heures d'immersion, puis leur concentration dans le SBF chute rapidement et se stabilise après 1 jour.

La diminution rapide de la concentration de ces éléments présents dans le SBF peut être corrélée à une formation précoce et un développement rapide de la couche de phosphate de calcium en surface, confirmés par les techniques de caractérisation utilisées. De plus, cette couche présente la particularité d'avoir cristallisée dès 5 jours d'immersion dans le SBF. En effet, pour ce délai, la surface des échantillons est recouverte d'un dépôt de particules en forme d'aiguilles, qui est caractéristique de la morphologie des cristaux d'hydroxyapatite. La diffraction des rayons X après 30 jours d'immersion confirme également la formation d'une couche d'hydroxyapatite à la surface du verre 46S6 Os ; la qualité de la cristallisation de cette couche est meilleure à délai équivalent comparativement au verre de référence 46S6. En effet, les raies principales à 26, 32 et 53° (2 $\theta$ ) sont mieux définies et de nouvelles raies de diffraction apparaissent à 28 et 50° (2 $\theta$ ). Enfin, entre 5 et 40 jours, les cristaux formés continuent de croître et leur densité augmente à la surface du 46S6 Os (figure 10.8). La croissance et le développement des cristaux d'hydroxyapatite a donc lieu selon un processus continu pendant les 40 premiers jours de test *in vitro* en milieu statique.

Les cinétiques de formation de la couche de phosphate de calcium et de cristallisation de l'hydroxyapatite sont donc plus rapides pour le verre 46S6 Os que pour le verre de référence 46S6. La présence de magnésium, de zinc et de strontium simultanément dans la matrice vitreuse améliore également la qualité de la cristallisation de l'hydroxyapatite.

De la même manière que le verre 46S6Mg120, un important relargage de silicium dans le SBF est observé pour le 46S6 Sup. Le calcium et le phosphore sont également relargués rapidement durant les premières heures d'immersion. Cependant, seule la concentration en phosphore diminue rapidement entre 2 et 24 heures pour se stabiliser par la suite. En effet, la concentration en calcium demeure constante après avoir atteint son maximum à un jour d'immersion. D'après les analyses EDS, la formation de la couche phosphocalcique débute dès un jour (ce qui a déjà été observé pour le 46S6Mg120 et le 46S6 Os) ; le calcium relargué dans le SBF n'est donc pas nécessaire au développement de cette couche, contrairement au phosphore.

A partir de 5 jours, le calcium et le phosphore sont les éléments majoritairement présents à la surface du 46S6 Sup ; cependant contrairement au 46S6 Os, aucune cristallisation n'est observée jusqu'à 30 jours d'immersion. La diffraction des rayons X indique néanmoins la présence d'une hydroxyapatite cristallisée à la surface du verre. La couche formée à la surface du 46S6 Sup après 30 jours serait donc une forme de phosphate de calcium cristallisée, mais présentant une morphologie différente de celle observée après 40 jours d'immersion. Après 30 jours d'immersion, les cristallites sont de trop petite taille pour pouvoir être observés au MEB ; mais même si la phase devient très finement divisée, le domaine de diffraction cohérent est suffisamment grand pour pouvoir diffracter. Après 40 jours, on retrouve la morphologie typique des cristaux d'hydroxyapatite en accord avec la diffraction des rayons X de cette même surface.

Le verre 46S6 Sup présente un comportement plus proche du verre dopé au magnésium 46S6Mg120 que du verre de référence 46S6, en ce qui concerne la dissolution de la matrice vitreuse et la morphologie de la couche d'hydroxyapatite. Ces similitudes peuvent être corrélées à la teneur en magnésium, identique pour ces deux compositions (1,2% en masse), mais l'effet de cet élément est tempéré par la présence du zinc et du strontium dans la matrice vitreuse.



## PARTIE 4

# **Etude structurale par RMN du solide des verres bioactifs**



## Chapitre 12

### Influence des éléments introduits sur le réseau vitreux

Nous nous sommes intéressés à l'étude de deux noyaux pour les six compositions de verres synthétisés :  $^{29}\text{Si}$  et  $^{31}\text{P}$ . Notre démarche a été d'effectuer une étude comparative des spectres RMN-MAS des verres afin de mieux comprendre l'influence et l'environnement chimique des éléments introduits dans la matrice vitreuse.

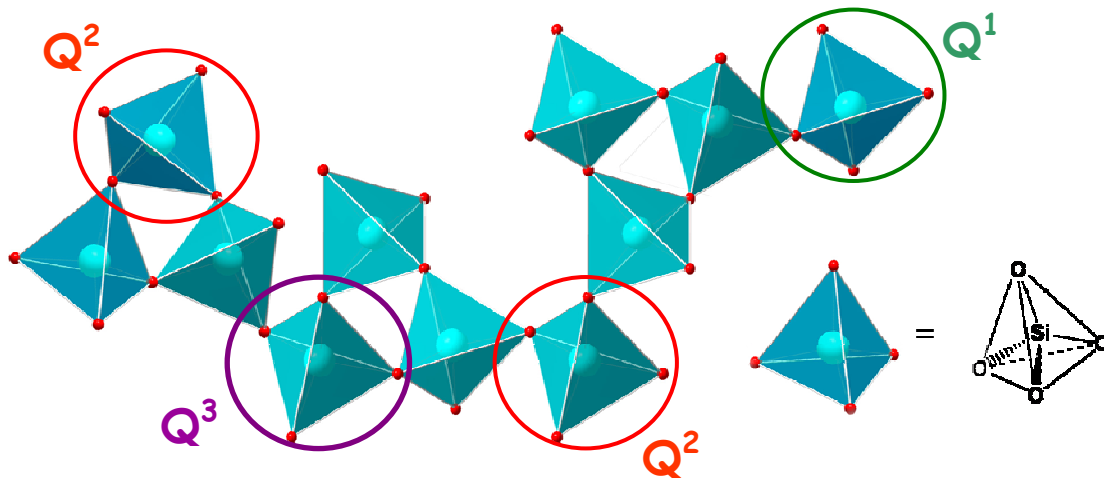
#### 1. Intérêt de l'étude des verres par RMN-MAS du solide

Le contrôle de la bioactivité *in vitro* et *in vivo*, ainsi que la dégradabilité des verres bioactifs synthétisés par fusion est un enjeu important dans le domaine des biomatériaux. En effet, la réactivité de la surface d'un implant dépend du taux de relargage de ces constituants. La formation de la couche d'apatite à la surface des vitro-céramiques bioactives est principalement provoquée par la phase vitreuse et peut être diminuée si la vitro-céramique est complètement cristallisée [122]. Ainsi, la connaissance de la structure des verres et de la phase vitreuse résiduelle des vitro-céramiques est d'une importance majeure, car le taux de relargage des différents éléments est principalement déterminé par la phase vitreuse.

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 2, la structure d'un verre est complexe ; il n'existe aucun ordre à longue distance, mais un ordre à courte distance est néanmoins présent. La structure de base d'un verre de silice est constituée d'un réseau de tétraèdres  $\text{SiO}_4$ , connectés par leurs sommets pour former un réseau tridimensionnel continu. Les oxydes alcalins et alcalino-terreux introduits modifient la structure du réseau et réduisent son degré de connectivité en remplaçant les oxygènes pontants (BO pour Bridging Oxygen) par des oxygènes non-pontants (NBO pour Non Bridging Oxygen). Ainsi, les oxydes modificateurs de réseau sont des éléments importants puisqu'ils ouvrent la structure du verre et abaissent la température de transition vitreuse.

La RMN du solide est une méthode puissante pour l'étude structurale des verres bioactifs. En effet, le déplacement chimique  $\delta$  est un indicateur sensible de l'environnement local d'un isotope donné ; il est dépendant de la densité électronique locale, qui reflète elle-même la distribution des atomes autour du noyau étudié. Le déplacement chimique renseigne ainsi sur l'environnement local présent autour d'un isotope et sur les éventuelles interactions entre deux noyaux.

Un modèle quantitatif pour l'étude des verres peut être obtenu en calculant les concentrations en oxygènes pontants et non-pontants par tétraèdre  $\text{SiO}_4$  comme une fonction de la concentration en oxydes alcalins. La notation  $Q^n$  exprime la concentration d'oxygènes pontants par tétraèdre, où la valeur de  $n$  est égale au nombre d'oxygènes pontants, comme le montre la figure 12.1 [123]. Ainsi, un tétraèdre complètement lié au réseau par 4 oxygènes pontants est noté comme une espèce  $Q^4$ , alors qu'un tétraèdre isolé, ne présentant aucun oxygène pontant, est noté  $Q^0$ . De plus, ces différentes espèces  $Q^n$  présentent des résonances dans des régions séparées du spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$ . A titre d'exemple, le spectre RMN  $^{29}\text{Si}$  de la silice pure  $\text{SiO}_2$  ne présente qu'une seule composante  $Q^4$ , située à un déplacement chimique d'environ -112 ppm [124].



**Figure 12.1.** Représentation schématique du réseau de tétraèdres  $\text{SiO}_4$  et des différentes espèces  $Q^n$  possibles

L'addition d'oxydes métalliques augmente le nombre moyen d'oxygènes par silicium, donc par tétraèdre, ce qui se traduit par une dépolymérisation du réseau vitreux et donc par une modification de la proportion des espèces  $Q^n$ . Ainsi, en utilisant des méthodes de déconvolution appropriées, l'analyse par RMN du noyau  $^{29}\text{Si}$  permet d'obtenir des informations quantitatives sur les proportions relatives d'espèces  $Q^n$  dans un système donné. Dans le cas de noyau de spin  $\frac{1}{2}$  dans des matrices amorphes, la déconvolution des spectres RMN s'effectue à l'aide d'une ou plusieurs gaussiennes. L'aire sous la courbe de chaque gaussienne est alors prise comme une mesure de la concentration en espèces  $Q^n$  [124].

## 2. Etude de la structure du verre 46S6

### 2.1. Etude par RMN-MAS $^{29}\text{Si}$ du 46S6

La figure 12.2 présente le spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  obtenu pour le verre 46S6, ainsi que le résultat de sa déconvolution. Ce dernier met en évidence deux contributions distinctes situées à -78,2 et -87,1 ppm. Ces contributions sont caractéristiques du silicium en environnement tétraédrique ; on peut les attribuer par ordre d'abondance :

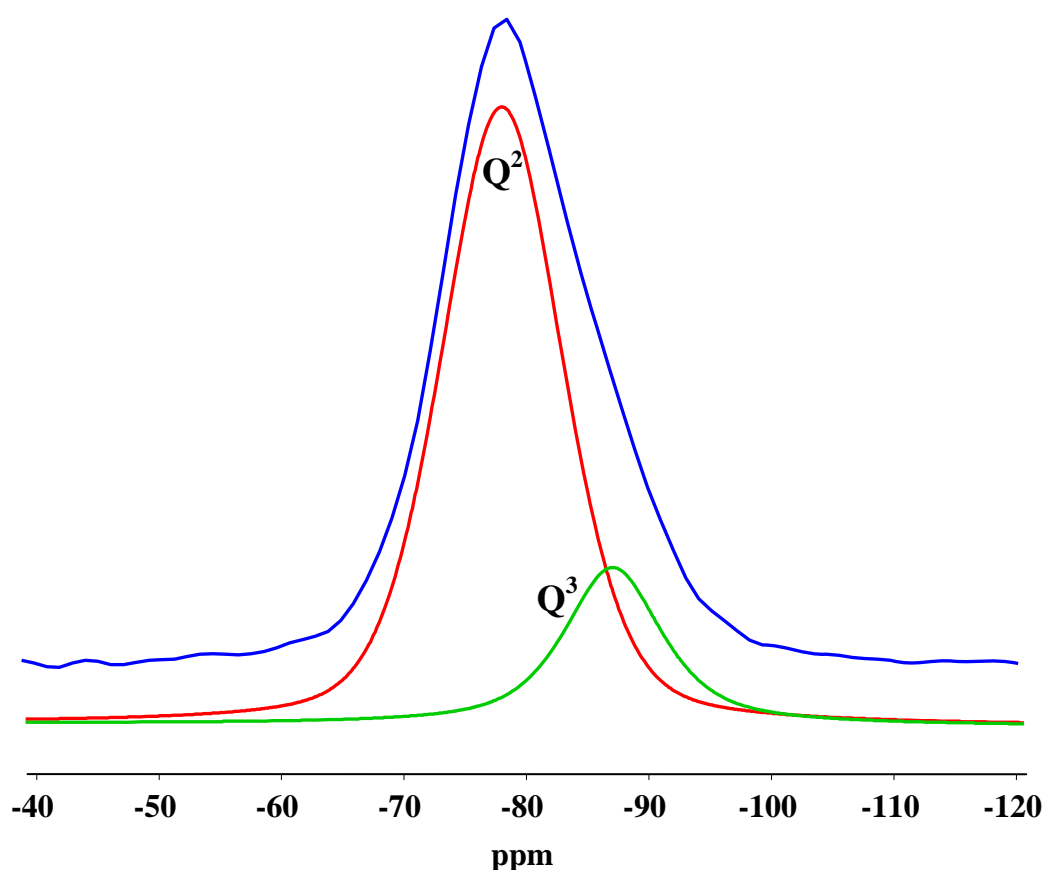
- aux **espèces  $Q^2$** , qui caractérisent des siliciums en environnement tétraédrique avec deux oxygènes pontants. Pour le verre 46S6, cette contribution se situe à -78,2 ppm et représente 80 % de la population des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ .
- aux **espèces  $Q^3$** , caractéristiques des siliciums en environnement tétraédrique avec trois oxygènes pontants. Pour le verre 46S6, cette contribution se situe à -87,1 ppm et représente 20 % de la population des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ .

Espèces $Q^n$	Systèmes étudiés		
	$\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$	$\text{CaO-SiO}_2$	46S6
$Q^2$	-76 ppm	-81,5 ppm	-78,2 ppm
$Q^3$	-86 ppm	-92 ppm	-87,1 ppm

**Tableau 12.1.** Déplacements chimiques des espèces  $Q^2$  et  $Q^3$  en RMN  $^{29}\text{Si}$  dans les systèmes  $\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$  et  $\text{CaO-SiO}_2$  et le verre 46S6 [125]



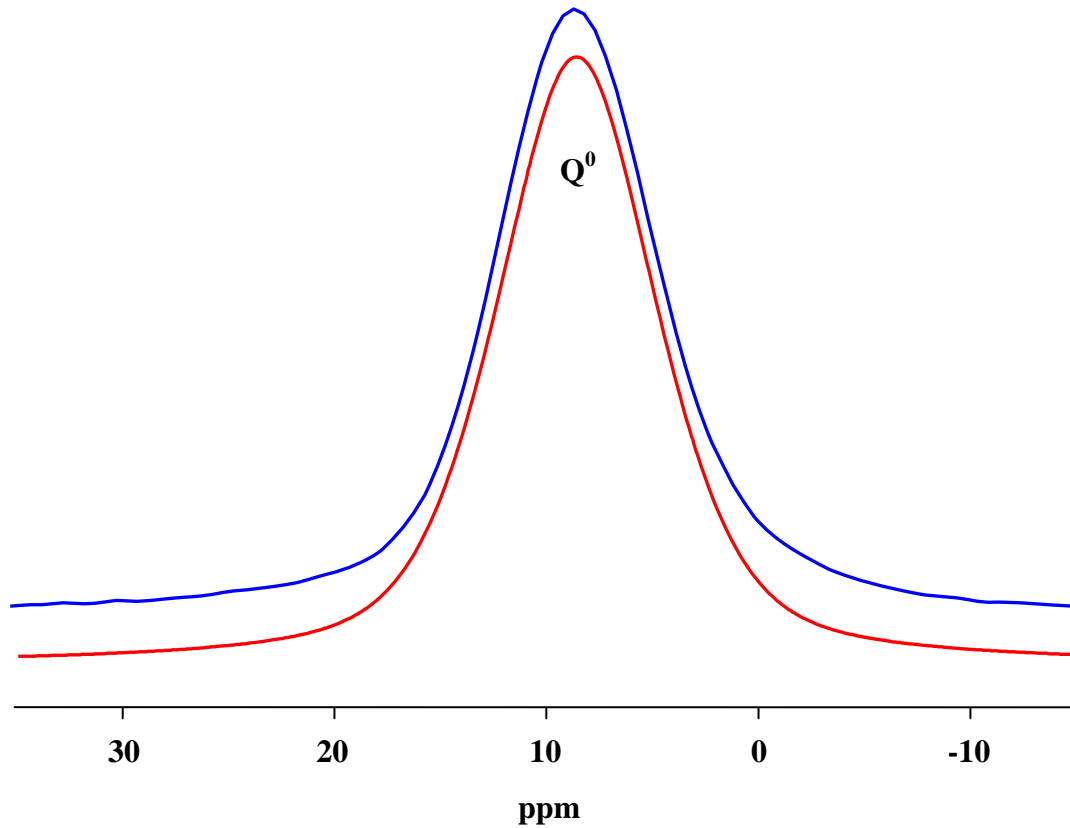
D'après les déplacements chimiques répertoriés dans le tableau 12.1, on peut également supposer que la neutralité chimique autour des oxygènes non-pontants des espèces  $Q^3$  est respectée par la présence préférentielle des cations  $Na^+$ . Les oxygènes des espèces  $Q^2$  sont alors plutôt combinés avec les cations  $Ca^{2+}$  et les cations  $Na^+$  restants [125].



**Figure 12.2.** Spectre RMN-MAS  $^{29}Si$  du verre 46S6 et sa déconvolution

## 2.2. Etude par RMN-MAS $^{31}P$ du 46S6

La figure 12.3 représente le spectre RMN-MAS  $^{31}P$  obtenu pour le verre 46S6. Ce dernier ne possède qu'une seule composante, centrée à 8,6 ppm, avec une largeur à mi-hauteur d'environ 9 ppm. Ces valeurs de déplacement chimique et de largeur à mi-hauteur sont caractéristiques des phosphores dans un environnement orthophosphate ( $PO_4^{3-}$ ).



**Figure 12.3.** Spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6 et sa déconvolution

Ce résultat correspond à ceux obtenus lors de travaux antérieurs, où une résonance simple, avec un déplacement chimique caractéristique d'un environnement orthophosphate, a été rapportée [125-127]. De plus, le déplacement chimique observé 8,6 ppm est compris entre le déplacement chimique en  $^{31}\text{P}$  de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (situé entre 10 et 16 ppm) et celui de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (situé entre 0 et 4 ppm) [125]. Ainsi, les groupements orthophosphates ne présentent pas d'association préférentielle avec l'un ou l'autre des cations. Ceci signifie que le phosphore est associé avec les cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , non utilisés par les oxygènes non-pontants des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ .

En attirant les cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  comme compensateurs de charges autour des groupements orthophosphates, le phosphore joue le rôle d'agent polymérisant du réseau de silice. En effet, une fois autour des  $\text{PO}_4^{3-}$ , les cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  ne sont plus modificateurs de réseau. Ceci permet la création de liaisons Si-O-Si, et par conséquent la polymérisation du réseau de silice, mise en évidence par l'apparition d'espèces  $Q^3$  à -87 ppm. En effet, dans le système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ , seule une résonance à -78 ppm, caractéristique des espèces  $Q^2$ , est observée par RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  [128].

### 2.3. Validation de la structure

Hill a introduit le concept de *modèle de polymère inorganique* et de *connectivité du réseau* (NC pour Network Connectivity) aux verres bioactifs [129]. Ce concept se base sur le fait que le réseau du verre peut être visualisé comme des chaînes de polymères inorganiques, constituées d'atomes de silicium et d'oxygènes, et où la neutralité électronique est assurée par les cations modificateurs, tels que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$ .

La *connectivité du réseau* NC est calculée grâce à la formule suivante, en supposant que l'oxyde  $\text{P}_2\text{O}_5$  joue le rôle de formateur de réseau et en utilisant les fractions molaires de chaque composant du verre :

$$NC = 2 + \frac{[(2 \cdot \text{SiO}_2) + (2 \cdot \text{P}_2\text{O}_5)] - [(2 \cdot \text{CaO}) + (2 \cdot \text{Na}_2\text{O})]}{\text{SiO}_2 + (2 \cdot \text{P}_2\text{O}_5)}$$

La *connectivité du réseau modifiée*, NC', est calculée quant à elle en supposant que le phosphore est dans un environnement orthophosphate, ce qui permet d'augmenter la connectivité du réseau. Dans ce cas, l'équation utilisée est la suivante :

$$NC' = 2 + \frac{(2 \cdot \text{SiO}_2) - [(2 \cdot \text{CaO}) + (2 \cdot \text{Na}_2\text{O}) - (2 \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 3)]}{\text{SiO}_2}$$

De la même manière, le nombre moyen d'oxygènes non-pontants par tétraèdre  $\text{SiO}_4$  (NBO/T) peut être utilisé comme mesure de la polymérisation du réseau de silice [130]. Cette valeur est calculée selon la formule :

$$NBO/T = \frac{2 \cdot (\text{Na}_2\text{O} + \text{CaO} - (3m + 2n)\text{P}_2\text{O}_5)}{\text{SiO}_2}$$

avec  $m$  et  $n$  les proportions molaires de complexes ortho et pyrophosphates, calculées à partir de la déconvolution du spectre RMN  $^{31}\text{P}$  ( $m + n = 1$ ). Dans le cas du 46S6, seuls des groupements orthophosphates ont été observés, ce qui implique que  $m = 1$ .

Le tableau 12.2 présente la composition molaire du verre 46S6. Les fractions molaires des différents composants nous permettent de calculer les valeurs de NC' et NBO/T.

46S6	SiO <sub>2</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
% molaires	47,2	26,4	23,8	2,6

**Tableau 12.2.** Composition molaire du verre 46S6

Nous obtenons ainsi une valeur de NC' égale à 2,2 et une valeur de NBO/T à 1,8. Il y a donc en moyenne dans notre verre 2,2 oxygènes pontants par tétraèdre SiO<sub>4</sub>. Ces valeurs sont donc en accord avec les proportions de Q<sup>2</sup> (80 %) et de Q<sup>3</sup> (20 %) obtenues par la déconvolution du spectre RMN <sup>29</sup>Si. En effet, il y a 80 % des tétraèdres avec 2 oxygènes pontants et 20 % avec 3 oxygènes pontants, ce qui fait bien une moyenne d'environ 2,2 oxygènes pontants par tétraèdre SiO<sub>4</sub>.

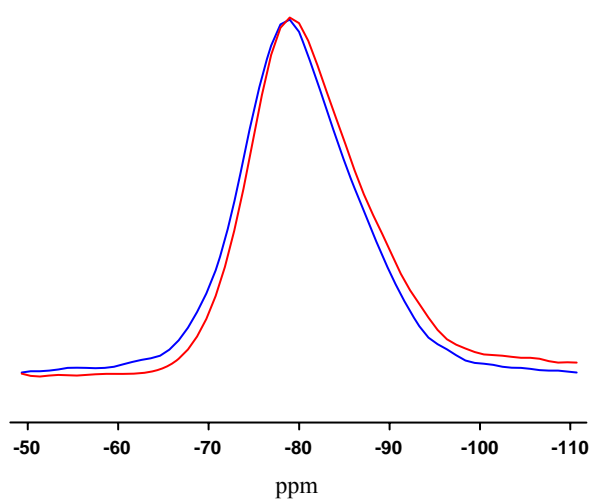
La structure du verre 46S6 est ainsi complètement déterminée et les déconvolutions effectuées sont validées par le modèle structural.

### 3. Etude de la structure des verres dopés

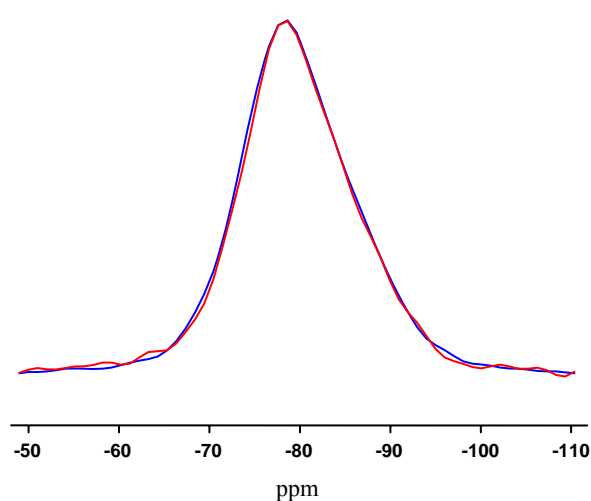
#### 3.1. Etude par RMN-MAS <sup>29</sup>Si

Les figures suivantes (figure 12.4 à 12.8) présentent les spectres RMN-MAS <sup>29</sup>Si des différentes compositions de verres dopés (en rouge), superposés avec le spectre du verre 46S6 (en bleu). Le tableau 12.3 regroupe les résultats obtenus lors des déconvolutions des spectres <sup>29</sup>Si.

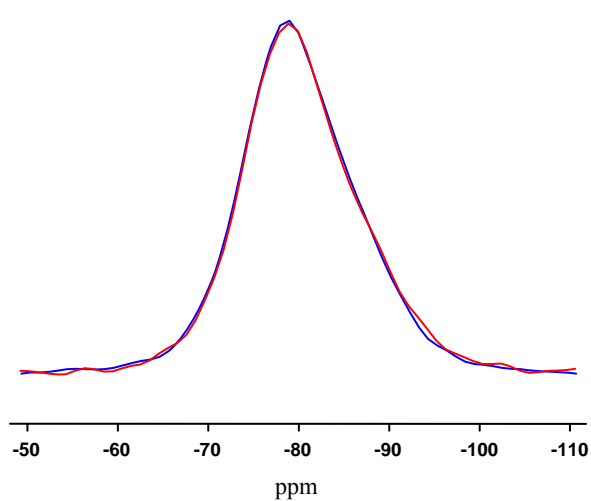
D'une manière générale, on observe très peu de différences entre les spectres des verres dopés et celui du verre 46S6. Seul le verre dopé au magnésium présente une modification significative du spectre <sup>29</sup>Si. Le zinc et le strontium sont introduits en trop faibles quantités pour pouvoir modifier la structure du réseau de silice. Les verres 46S6 Os et 46S6 Sup ne montrent pas également de changements significatifs dans leur structure.



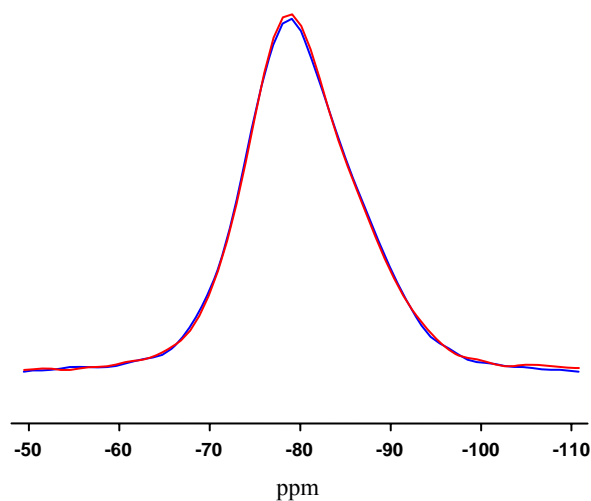
**Figure 12.4.** Spectres RMN  $^{29}\text{Si}$  du 46S6  
et du 46S6Mg120



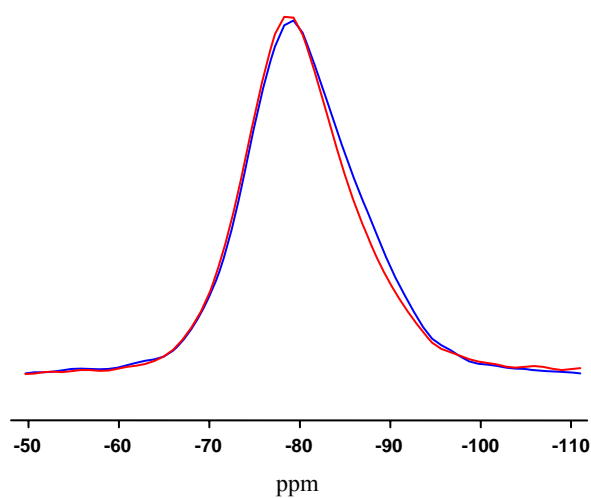
**Figure 12.5.** Spectres RMN  $^{29}\text{Si}$  du 46S6  
et du 46S6Zn10



**Figure 12.6.** Spectres RMN  $^{29}\text{Si}$  du 46S6  
et du 46S6Sr10



**Figure 12.7.** Spectres RMN  $^{29}\text{Si}$  du 46S6  
et du 46S6 Os

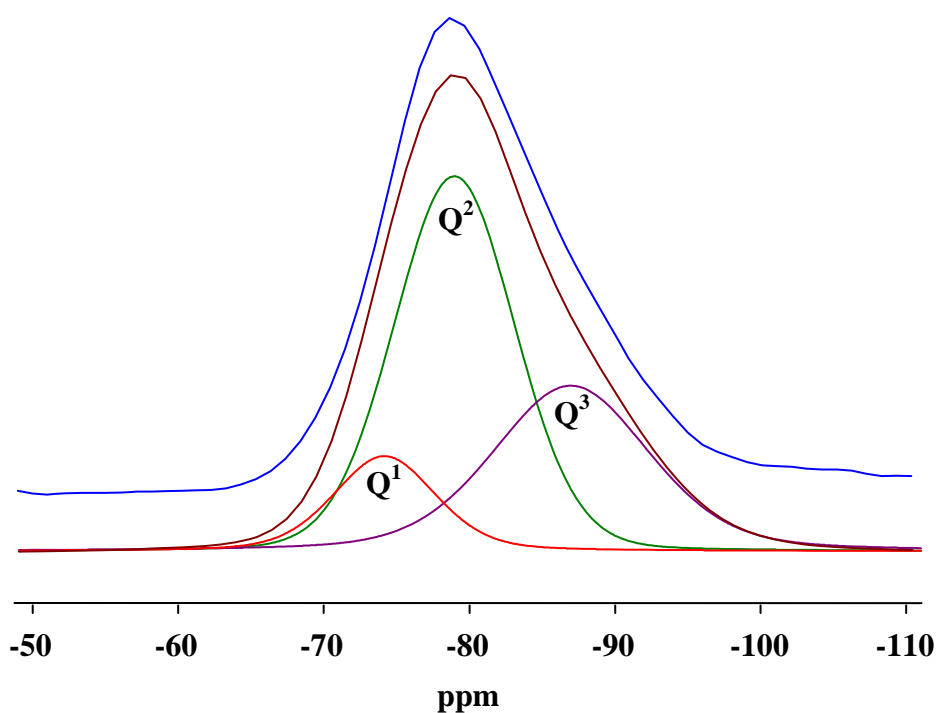


**Figure 12.8.** Spectres RMN  $^{29}\text{Si}$  du 46S6  
et du 46S6 Sup

Echantillon	Unités	$\delta(^{29}\text{Si})$ ppm	Population ( $\pm 3\%$ )
46S6	$Q^2$	-78,2	80
	$Q^3$	-87,1	20
46S6Mg120	$Q^1$	-74,1	13
	$Q^2$	-78,9	54
	$Q^3$	-86,9	33
46S6Zn10	$Q^2$	-78,2	82
	$Q^3$	-87,0	18
46S6Sr10	$Q^2$	-78,2	79
	$Q^3$	-86,9	21
46S6Os	$Q^2$	-78,2	80
	$Q^3$	-87,0	20
46S6Sup	$Q^2$	-77,8	83
	$Q^3$	-86,5	17

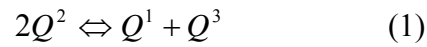
**Tableau 12.3.** Résultats de la déconvolution des spectres RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  des différents verres

Pour le verre dopé au magnésium, on observe une diminution d'environ 26 % de la proportion de  $Q^2$  au profit de l'apparition d'espèces  $Q^1$  et de l'augmentation de la proportion en espèces  $Q^3$ . La figure 12.9 présente le résultat de la déconvolution du spectre  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6Mg120.



**Figure 12.9.** Déconvolution du spectre RMN  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6Mg120

L'introduction d'une contribution de type  $Q^1$  est indispensable pour rendre compte de la forme de la raie. Il y a donc transformation d'une partie des espèces  $Q^2$  en espèces  $Q^1$  et  $Q^3$ , selon la réaction :



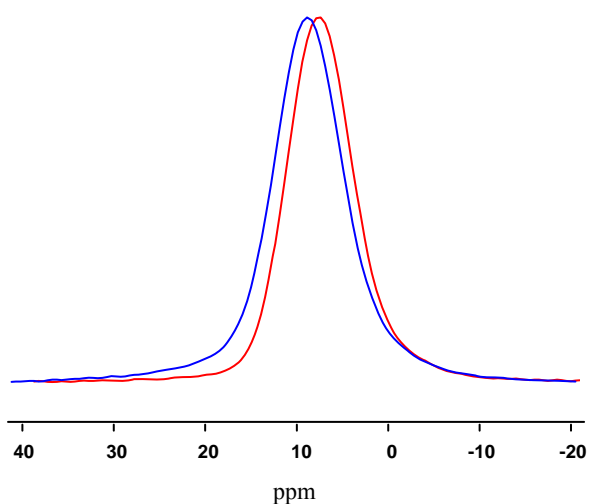
L'introduction des 2% de MgO se fait au détriment des proportions de CaO et Na<sub>2</sub>O dans la composition du verre. La quantité de silicium restant constante, la réaction (1) permet de conserver le nombre moyen d'oxygènes par tétraèdre SiO<sub>4</sub>. Un processus similaire a été proposée pour les verres alcalins, mais peu d'études ont été réalisées sur les détails de la structure des espèces de silicium Q pour les verres contenant des alcalino-terreux [131]. Cette réaction est néanmoins en parfait accord avec l'évolution du pourcentage (environ +13 %) de la proportion en espèce  $Q^3$ , sans faire varier la quantité de silicium totale. La proportion de  $Q^2$  ayant diminuée de 26 % et celle de  $Q^1$  apparue étant d'environ 13 %, la réaction est bien respectée.

Le magnésium introduit n'agit donc pas uniquement comme modificateur de réseau, en se substituant au calcium et au sodium dans la composition du verre. Il modifie la réticulation du réseau vitreux. Notons que les ions  $Mg^{2+}$  ne peuvent pas simplement se substituer aux cations  $Na^+$  : il y a alors rupture locale de liaisons Si-O-Si afin de pouvoir respecter la neutralité électronique.

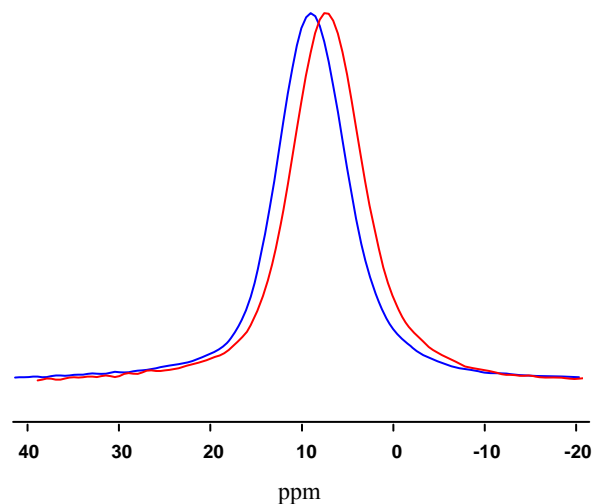
### 3.2. Etude par RMN-MAS $^{31}P$

Les figures suivantes (figure 12.10 à 12.14) présentent les spectres RMN-MAS  $^{31}P$  des différentes compositions de verres dopés (en rouge), superposés avec le spectre du verre 46S6 (en bleu). Le tableau 12.4 regroupe les résultats obtenus lors des déconvolutions des spectres  $^{31}P$ .

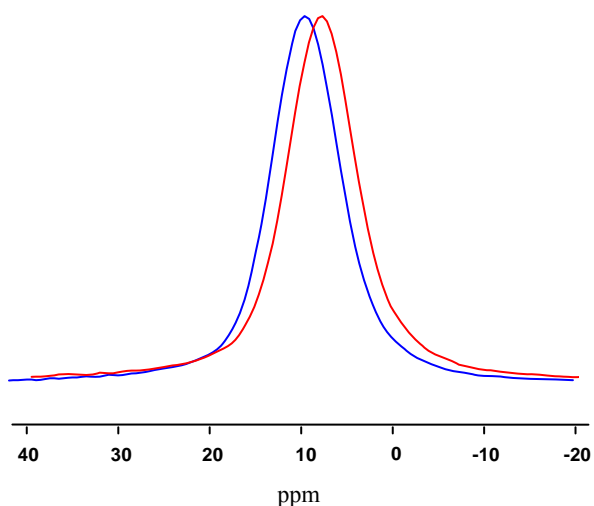
De la même façon que lors de l'étude en  $^{29}Si$ , on observe très peu de différences entre les spectres des verres dopés et celui du verre 46S6. Un léger décalage vers la droite des spectres est observé pour les verres dopés au magnésium, au zinc et au strontium, alors que les verres 46S6 Os et 46S6 Sup ne montrent pas de changements significatifs dans l'environnement des phosphores. L'environnement du noyau  $^{31}P$  ne semble pas du tout sensible à l'introduction de ces cations métalliques en faibles quantités.



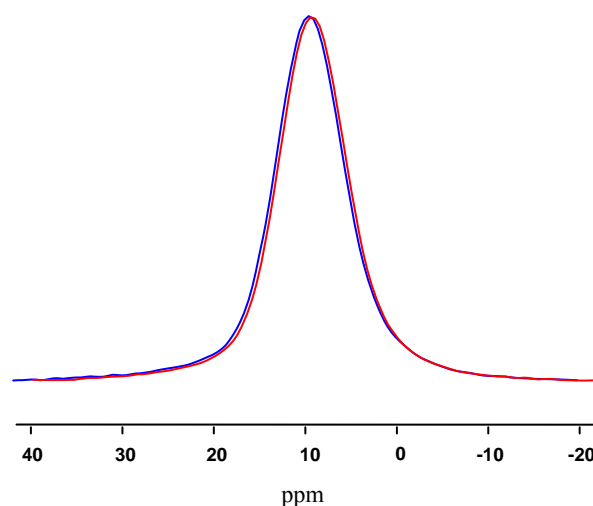
**Figure 12.10.** Spectres RMN  $^{31}\text{P}$  du 46S6  
et du 46S6Mg120



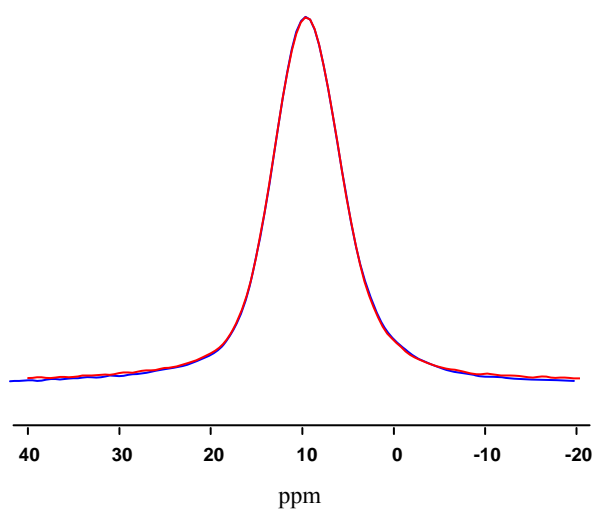
**Figure 12.11.** Spectres RMN  $^{31}\text{P}$  du 46S6  
et du 46S6Zn10



**Figure 12.12.** Spectres RMN  $^{31}\text{P}$  du 46S6  
et du 46S6Sr10



**Figure 12.13.** Spectres RMN  $^{31}\text{P}$  du 46S6  
et du 46S6 Os



**Figure 12.14.** Spectres RMN  $^{31}\text{P}$  du 46S6  
et du 46S6 Sup

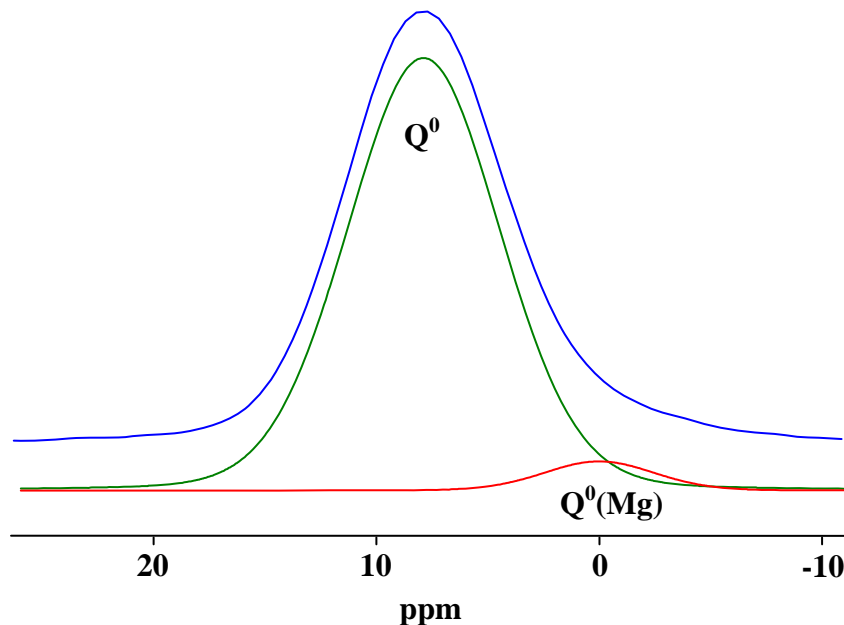


Echantillon	Unités	$\delta(^{31}\text{P})$ ppm	Population ( $\pm 3\%$ )
46S6	$\text{PO}_4$	8,6	100
46S6Mg120	$\text{PO}_4$	7,9	95
	$\text{PO}_4$	0	5
46S6Zn10	$\text{PO}_4$	7,5	100
46S6Sr10	$\text{PO}_4$	7,3	100
46S6 Os	$\text{PO}_4$	8,5	100
46S6 Sup	$\text{PO}_4$	8,5	100

**Tableau 12.4.** Résultats de la déconvolution des spectres RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  des différents verres

Les spectres RMN  $^{31}\text{P}$  des différents verres dopés, à l'exception de celui du 46S6Mg120, ne possèdent qu'une seule composante, centrée entre 7,3 et 8,5 ppm, avec une largeur à mi-hauteur moyenne d'environ 9 ppm. Cette composante est caractéristique des phosphores dans un environnement orthophosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

La figure 12.15 présente le résultat de la déconvolution du spectre  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6Mg120. On observe la présence de deux composantes, respectivement centrées à 7,9 ppm ( $\approx 95\%$  de la population) et 0 ppm ( $\approx 5\%$  de la population). Il est nécessaire d'introduire une seconde contribution à 0 ppm pour rendre compte de ce spectre. Compte tenu de l'excellent rapport signal sur bruit, il n'y a pas de doute quant à l'existence d'une telle contribution à hauteur de 5 %.



**Figure 12.15.** Déconvolution du spectre RMN  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6Mg120

Comme nous l'avons vu lors de l'étude du 46S6, le déplacement chimique observé à environ 8 ppm est compris entre le déplacement chimique en  $^{31}\text{P}$  de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  et celui de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , et les groupements  $\text{PO}_4^{3-}$  ne présentent pas d'association préférentielle avec  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Na}^+$ .

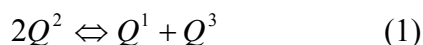
L'apparition de la composante à 0 ppm, spécifique au verre 46S6Mg120, est certainement due à la présence de magnésium dans la matrice vitreuse. Le spectre RMN  $^{31}\text{P}$  de  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  possède une unique composante centrée à 0 ppm [132]. De plus, le déplacement chimique de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  étant situé également aux environs de 0 ppm, on peut attribuer cette seconde composante à un environnement orthophosphate, associé aux cations  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4. Influence des éléments introduits sur le réseau vitreux

La caractérisation par RMN-MAS du solide a permis de définir la structure du verre de référence 46S6. Les résultats expérimentaux obtenus sont en accord avec la littérature et les calculs de *connectivité du réseau*. La RMN du  $^{29}\text{Si}$  indique que le silicium présente deux types d'environnement tétraédrique ; l'espèce  $\text{Q}^2$  représente 80 % de la population et l'espèce  $\text{Q}^3$  est présente pour les 20 % restants. L'ensemble des phosphores sont dans un environnement orthophosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ . Les cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  présents s'associent avec les espèces anioniques comme suit :

- autour des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ , les  $\text{Ca}^{2+}$  s'associent préférentiellement avec les espèces  $\text{Q}^2$ , et les  $\text{Na}^+$  avec les espèces  $\text{Q}^3$ ,
- aucune association préférentielle n'a été observée autour des  $\text{PO}_4^{3-}$ .

L'introduction du magnésium modifie la structure même du réseau vitreux par rupture de liaisons Si-O-Si, afin de préserver localement la neutralité électronique. On observe ainsi l'apparition d'une nouvelle composante  $\text{Q}^1$ , accompagnée d'une augmentation de la population d'espèces  $\text{Q}^3$  et d'une diminution de la population d'espèces  $\text{Q}^2$ , suivant la réaction (1) :



De plus, par rapport aux résultats obtenus par RMN  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6, on observe l'apparition d'un second environnement orthophosphate pour le verre 46S6Mg120. Ce dernier est caractéristique des  $\text{PO}_4^{3-}$  associés aux cations  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, l'introduction de 2 % de MgO dans la composition du verre 46S6Mg120 entraîne des variations significatives de l'environnement des siliciums et des phosphores dans la matrice vitreuse.

A l'inverse, les teneurs en zinc et en strontium introduites dans la matrice vitreuse (0,1 % en élément) sont trop faibles pour induire des modifications dans la structure du réseau. Seule une légère variation du déplacement chimique est observée sur le spectre  $^{31}\text{P}$ , mais ce dernier reste caractéristique des phosphores dans un environnement orthophosphate.

Enfin, les verres 46S6 Os et 46S6 Sup ne présentent aucune variation significative dans l'environnement des siliciums et des phosphores, malgré la teneur en magnésium introduite (respectivement 0,5 et 1,2 %). Ce comportement pourrait s'expliquer par la présence simultanée du zinc et du strontium dans la matrice vitreuse qui annihile l'effet du magnésium sur le réseau vitreux. Des études complémentaires sont prévues (variations des teneurs en éléments et introduction des éléments deux par deux) afin de comprendre et d'évaluer les interactions entre les éléments introduits.

## Chapitre 13

### Modifications structurales des verres lors des tests *in vitro*

Après avoir mis en évidence, dans le chapitre précédent, l'influence des éléments dopants sur la structure des verres, ce chapitre est consacré à l'étude des modifications structurales se produisant lors des tests *in vitro*. L'étude des noyaux  $^{29}\text{Si}$  et  $^{31}\text{P}$  par RMN du solide a été couplée aux analyses par ICP-OES des solutions de SBF (Chapitre 14) pour différents délais d'immersion. L'objectif de ce chapitre est de déterminer l'influence, au niveau structural, des éléments introduits sur le mécanisme de bioactivité des verres, et en particulier sur la formation d'hydroxyapatite.

#### 1. Originalité de l'étude de la structure des verres après immersion

Connaître l'évolution de la structure des verres lors des tests *in vitro* est particulièrement important afin de mieux comprendre le comportement du matériau et de caractériser ses propriétés à long-terme.

A notre connaissance, aucune étude structurale par RMN-MAS du solide sur les interactions entre les verres bioactifs et le SBF n'a été menée, et d'une manière générale, très peu d'études de ce type ont été réalisées sur les verres. La première concernait l'altération de verres borosilicatés à différents pH [133] ; l'une des plus récentes portait sur l'influence de la composition sur l'altération de verres de silice [134]. Ces études ont mis en évidence la transformation d'oxygènes non-pontants en groupements hydroxyles, aboutissant à la formation de silanols. Cette transformation a lieu quelle que soit la nature du milieu d'immersion (eau, solution acide ou basique,...) [133].

Cette étude, par RMN-MAS de la structure des verres après immersion dans le SBF, constitue donc une approche originale de la compréhension du processus de bioactivité.

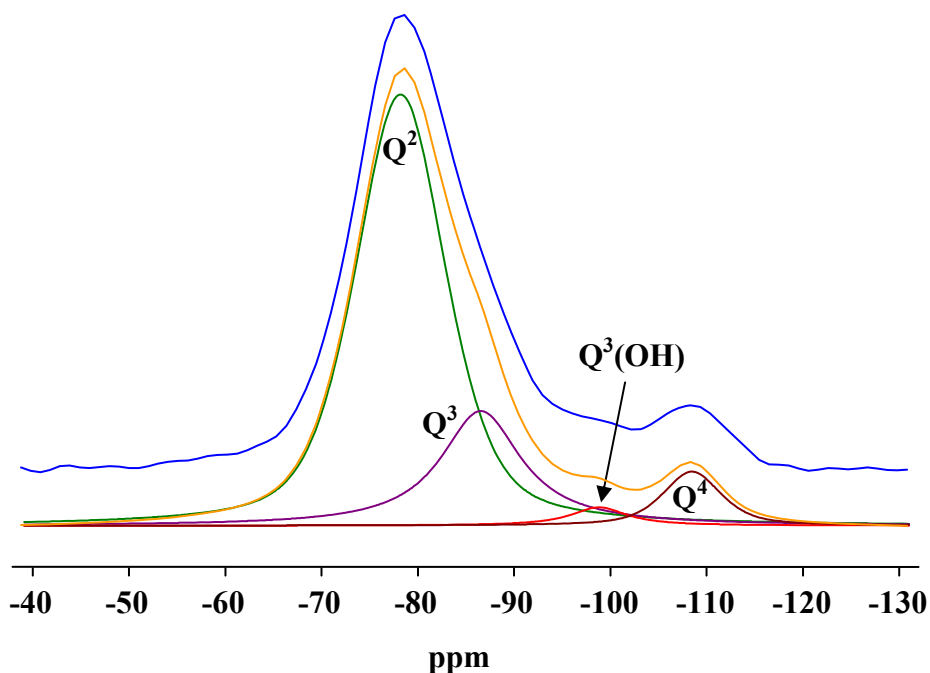
## 2. Evolution de la structure du verre 46S6 lors des tests *in vitro*

Les tests *in vitro* se sont déroulés suivant le protocole présenté dans le Chapitre 5. Pour chaque composition de verre, la même quantité de poudre a été immergée dans le SBF suivant quatre délais d'immersion, compris entre 1 jour et 15 jours. Les poudres séchées ont été analysées par RMN du solide, IR et MEB-EDS ; les compositions élémentaires des solutions de SBF ont été déterminées par ICP-OES.

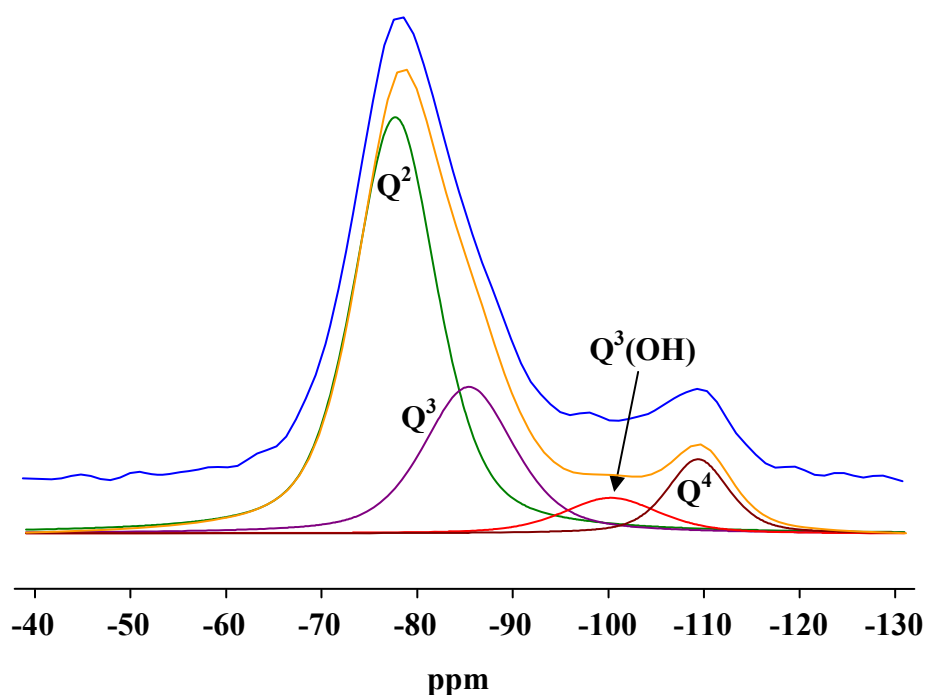
### 2.1. Etude par RMN-MAS $^{29}\text{Si}$ du 46S6

Les figures 13.1 à 13.3 présentent les spectres RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  obtenus pour le verre 46S6 après 1, 7 et 15 jours d'immersion dans le SBF, et leurs déconvolutions.

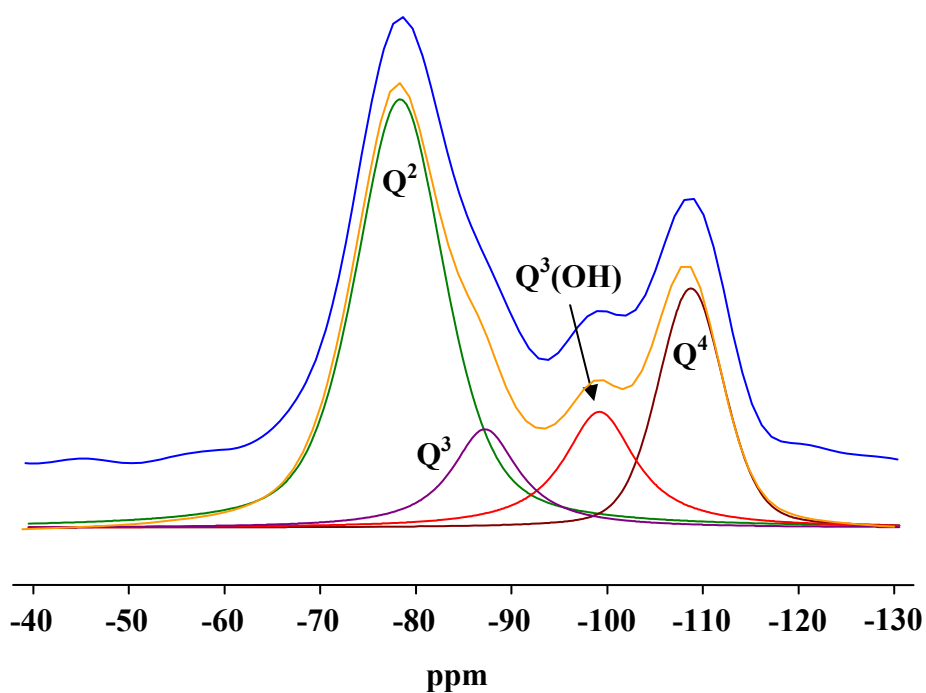
D'importants changements sont constatés sur ces figures ; le profil des spectres  $^{29}\text{Si}$  évolue avec le temps d'immersion dans le SBF, ce qui indique d'importantes modifications de la structure des verres lors des tests *in vitro*.



**Figure 13.1.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6 après 1 jour d'immersion



**Figure 13.2.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6 après 7 jours d'immersion



**Figure 13.3.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6 après 15 jours d'immersion

Le tableau 13.1 regroupe les résultats obtenus (proportions de chaque espèce et déplacement chimique associé) lors des déconvolutions des spectres  $^{29}\text{Si}$ . Quelle que soit la durée du délai d'immersion, quatre composantes sont nécessaires pour déconvoluer les spectres obtenus, au lieu de deux pour le verre 46S6 avant immersion.

46S6 RMN $^{29}\text{Si}$						
Populations $\pm 3\%$ (déplacement chimique $\delta$ )						
Espèces	$Q^2$	$Q^3$	$Q^2 + Q^3$	$Q^3(\text{OH})$	$Q^4$	$Q^3(\text{OH}) + Q^4$
<b>Avant immersion</b>	80 % (-78,3 ppm)	20 % (-87,1 ppm)	<b>100 %</b>			
<b>1 jour</b>	71 % (-78,2 ppm)	21 % (-86,5 ppm)	<b>92 %</b>	2 % (-98,8 ppm)	6 % (-108,5 ppm)	<b>8 %</b>
<b>7 jours</b>	62 % (-77,7 ppm)	24 % (-85,4 ppm)	<b>86 %</b>	6 % (-100,3 ppm)	8 % (-109,4 ppm)	<b>14 %</b>
<b>15 jours</b>	54 % (-78,3 ppm)	11 % (-87,3 ppm)	<b>65 %</b>	14 % (-99,4 ppm)	21 % (-109 ppm)	<b>35 %</b>

**Tableau 13.1.** Résultats de la déconvolution des spectres RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6

Après immersion, les deux composantes  $Q^2$  et  $Q^3$ , initialement présentes dans le réseau vitreux, sont encore observées, respectivement à environ -78 et -87 ppm. On constate néanmoins des variations dans leurs proportions relatives, au profit de l'apparition des deux nouvelles espèces. Ces dernières sont également caractéristiques du silicium en environnement tétraédrique et sont attribuées :

- aux **espèces  $Q^3(\text{OH})$**  ; cette espèce caractérise les siliciums en environnement tétraédrique avec trois oxygènes pontants et le dernier oxygène relié à un groupement silanol [135]. Cette contribution se situe à environ -100 ppm et représente, selon les délais d'immersion, 2 à 14 % de la population des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ .
- aux **espèces  $Q^4$** , caractéristiques des siliciums en environnement tétraédrique avec quatre oxygènes pontants. Sur les spectres RMN, cette contribution se situe à environ -109 ppm et représente, selon les délais d'immersion, 6 à 21 % de la population des tétraèdres  $\text{SiO}_4$ . A titre de référence, le déplacement chimique  $^{29}\text{Si}$  de la silice pure ( $\text{SiO}_2$ ) se situe à -111 ppm [136].

D'après le mécanisme de Hench, décrit au Chapitre 10, trois étapes principales se succèdent à la surface des verres bioactifs, lorsque ces derniers sont en contact avec un milieu physiologique simulé. Ces trois étapes sont l'échange ionique (ou désalcalinisation), la dissolution et la précipitation.

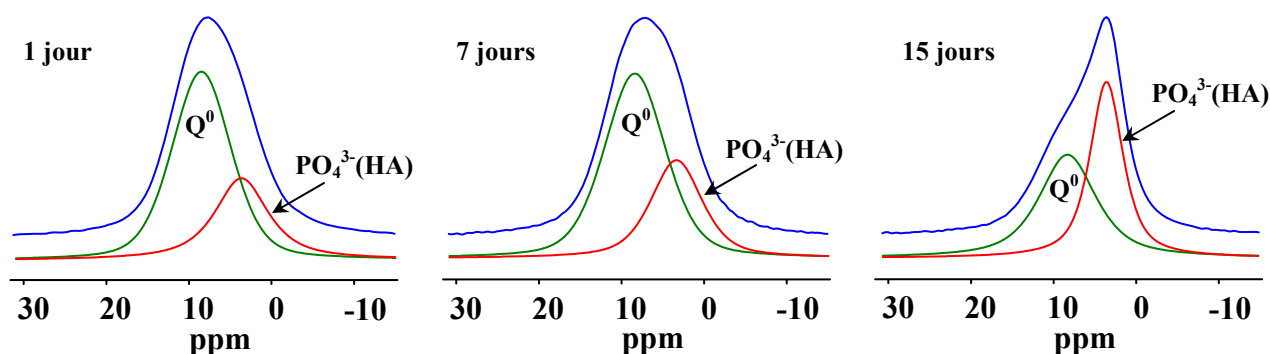
Durant la première étape, les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  présents à la surface du verre sont échangés rapidement avec les ions  $\text{H}^+$  présents dans le SBF. La seconde étape correspond à la dissolution du réseau vitreux ; les liaisons Si-O-Si se rompent à la surface du verre sous l'action des hydroxyles. Des groupements silanols ( $\text{SiOH}$ ) sont alors formés en surface, puis une partie de ces groupements se condensent pour former une couche riche en silice. Enfin, durant la dernière étape, on observe la précipitation d'une couche riche en phosphate de calcium.

L'étude RMN  $^{29}\text{Si}$  permet de suivre plus particulièrement l'étape de dissolution du réseau vitreux. En effet, la somme ( $Q^2 + Q^3$ ) renseigne sur le pourcentage de réseau de silice affecté par la dissolution du verre. Avec l'augmentation du temps d'immersion, la valeur ( $Q^2 + Q^3$ ) diminue fortement. En parallèle, dès 1 jour d'immersion, nous assistons à la formation des espèces  $Q^3(\text{OH})$  et  $Q^4$  qui témoignent de la dissolution du réseau vitreux. De plus, la proportion d'espèces  $Q^4$  est supérieure à celle des  $Q^3(\text{OH})$  quel que soit le temps d'immersion dans le SBF. Ainsi, une majorité des groupements silanols se repolymérisent immédiatement à la surface du verre pour former la couche riche en silice. On remarque également que le déplacement chimique des  $Q^4$  est très proche de celui de la silice pure (109 contre 111 ppm) ; la couche riche en  $\text{SiO}_2$  formée à la surface du 46S6 présente donc peu d'impuretés. Enfin, entre 7 et 15 jours, la proportion d'espèces ( $Q^3(\text{OH}) + Q^4$ ) continue d'augmenter. Or pour ces délais d'immersion, on assiste également à la formation d'hydroxyapatite à la surface des verres (Chapitre 6). Ceci signifie que la précipitation de l'hydroxyapatite n'inhibe pas la dissolution du réseau vitreux ; ces deux phénomènes se produisent simultanément. Il est donc très probable que la couche riche de silice continue d'évoluer en même temps que la couche d'hydroxyapatite.

## 2.2. Etude par RMN-MAS $^{31}\text{P}$ du 46S6

La figure 13.4 représente les spectres RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  obtenus pour le verre 46S6 après 1, 7 et 15 jours d'immersion dans le SBF, et leurs différentes composantes. De la même manière que lors de l'étude en  $^{29}\text{Si}$ , on observe sur ces figures d'importants changements ; le profil des spectres  $^{31}\text{P}$  évolue avec le temps d'immersion dans le SBF, ce qui peut être corrélé à la formation de la couche d'hydroxyapatite à la surface du 46S6 lors des tests *in vitro*.





**Figure 13.4.** Spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6 après 1, 7 et 15 jours d'immersion

Le tableau 13.2 regroupe les résultats obtenus (proportions de chaque espèce et déplacement chimique associé) lors des déconvolutions des spectres  $^{31}\text{P}$ .

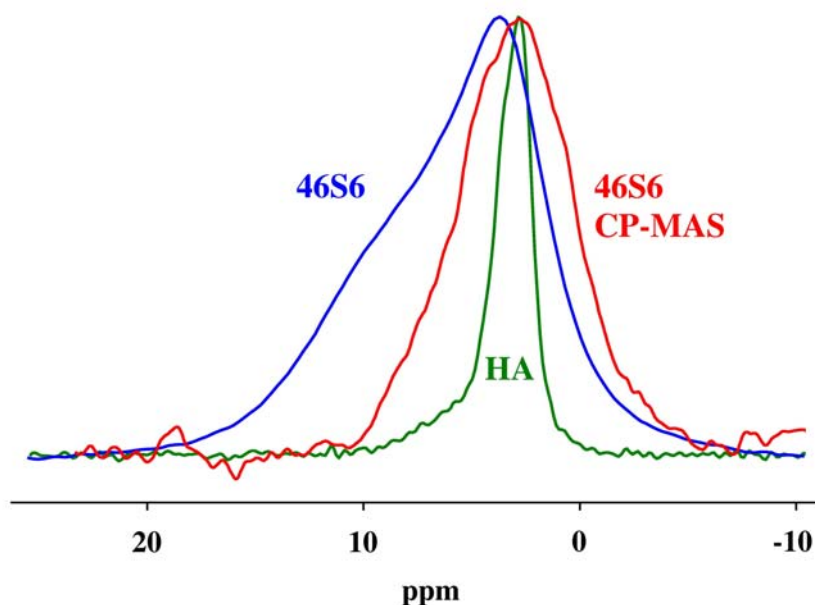
46S6	RMN $^{31}\text{P}$	
	Populations $\pm 3\%$ (déplacement chimique $\delta$ )	
Espèces	$\text{Q}^0$	$\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$
<b>Avant immersion</b>	100 % (8,6 ppm)	
<b>1 jour</b>	67,9 % (8,5 ppm)	32,1 % (3,6 ppm)
<b>7 jours</b>	67,7 % (8,5 ppm)	32,4 % (3,4 ppm)
<b>15 jours</b>	45,8 % (8,3 ppm)	54,2 % (3,5 ppm)

**Tableau 13.2.** Résultats de la déconvolution des spectres RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6

L'évolution spectrale principale réside donc en l'apparition d'une seconde raie à environ 3,5 ppm, notée  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$ , car très probablement liée à la formation de l'hydroxyapatite.

La figure 13.5 représente le spectre obtenu (en bleu) par CP-MAS  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  (CP pour cross polarization) et le spectre  $^{31}\text{P}$  de l'hydroxyapatite naturelle (en violet). Le CP-MAS consiste à profiter de la présence de noyaux abondants et sensibles (ici le  $^1\text{H}$ ) à proximité de noyaux faiblement sensibles pour transférer l'aimantation des premiers sur les seconds et ainsi favoriser l'observation de leur signal (voir annexe 3 pour le détail de la séquence).

Dans notre cas, le  $^{31}\text{P}$  est un excellent noyau qui ne nécessite pas la mise en œuvre d'une séquence de polarisation croisée pour être sondé. Le but de cette expérience est de révéler les noyaux  $^{31}\text{P}$  qui se trouvent à proximité de noyaux  $^1\text{H}$ . En effet, le transfert de l'aimantation  $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$  ne s'effectue favorablement que si ces noyaux sont à proximité les uns des autres dans l'échantillon.



**Figure 13.5.** Spectres  $^{31}\text{P}$  (bleu) et CP-MAS  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  (rouge) du verre 46S6 après 15 jours d'immersion et spectre  $^{31}\text{P}$  de l'hydroxyapatite naturelle (vert)

L'analyse par polarisation croisée CP-MAS  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  permet donc de mettre en évidence la composante des phosphores liés préférentiellement aux protons. Sur la figure 13.5, on constate alors que seule la composante à -3,5 ppm reste présente sur le spectre. De plus, le déplacement chimique des phosphores présents dans l'hydroxyapatite naturelle coïncide avec cette composante. Cette contribution peut donc être définitivement attribuée à la couche d'hydroxyapatite qui est constituée à la fois de tétraèdres  $\text{PO}_4^{3-}$  et de groupements hydroxyles  $\text{OH}^-$ .

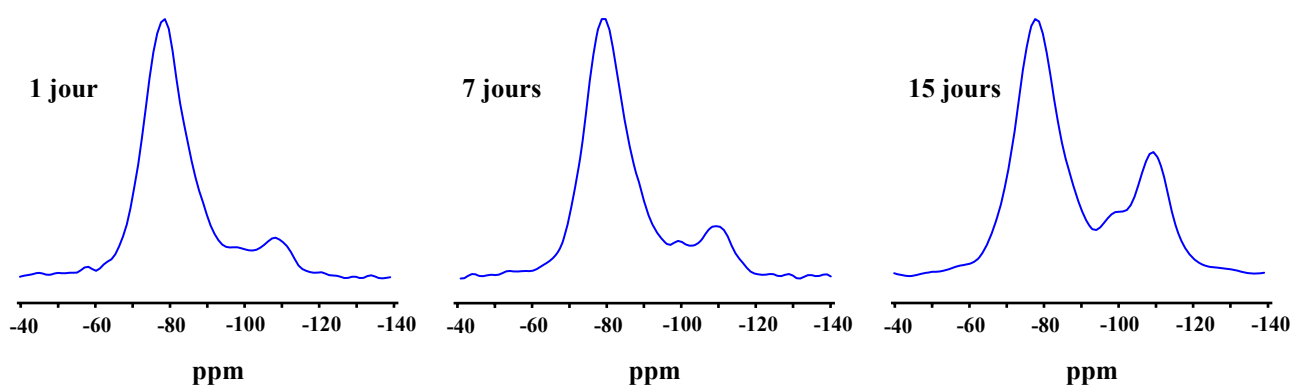
L'apparition de cette nouvelle composante, notée  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$ , témoigne ainsi de la formation progressive d'une couche d'hydroxyapatite à la surface des verres, lors des tests *in vitro*. De plus, d'après les proportions des deux composantes (tableau 13.2), il semble que la formation d'apatite ne soit pas linéaire en fonction du temps d'immersion, car peu de différences sont observées entre 1 et 7 jours d'immersion.

### 3. Influence des éléments introduits sur l'évolution de la structure lors des tests *in vitro*

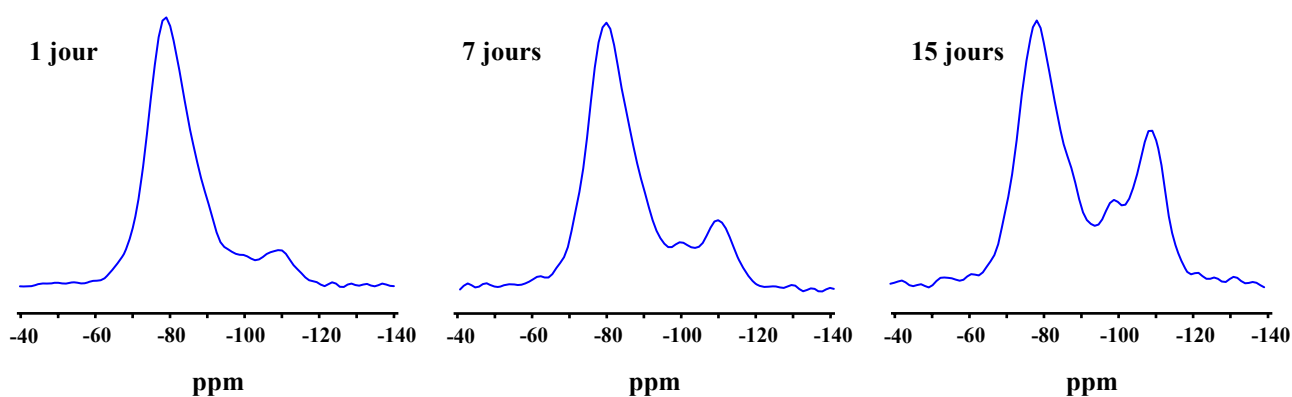
Une étude similaire à la précédente a été effectuée sur les différentes compositions de verres dopés, afin de déterminer du point de vue structural l'influence des éléments introduits sur la réactivité chimique du verre et sur la cinétique de formation de l'hydroxyapatite.

#### 3.1. Etude par RMN-MAS $^{29}\text{Si}$ du 46S6

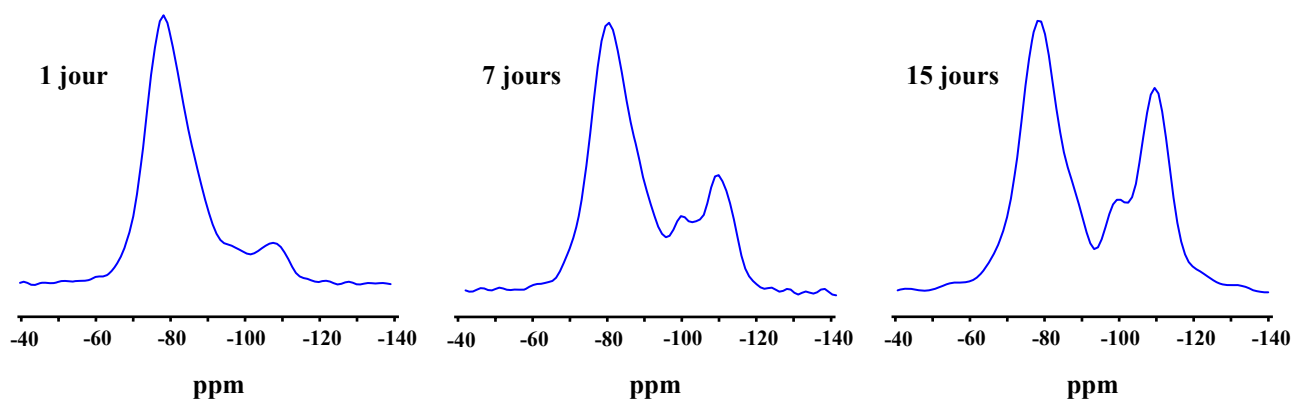
Les figures suivantes (figure 13.6 à 13.10) représentent les spectres RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  des différentes compositions de verres dopés après les différents délais d'immersion dans la SBF (de gauche à droite : 1 jour, 7 jours et 15 jours).



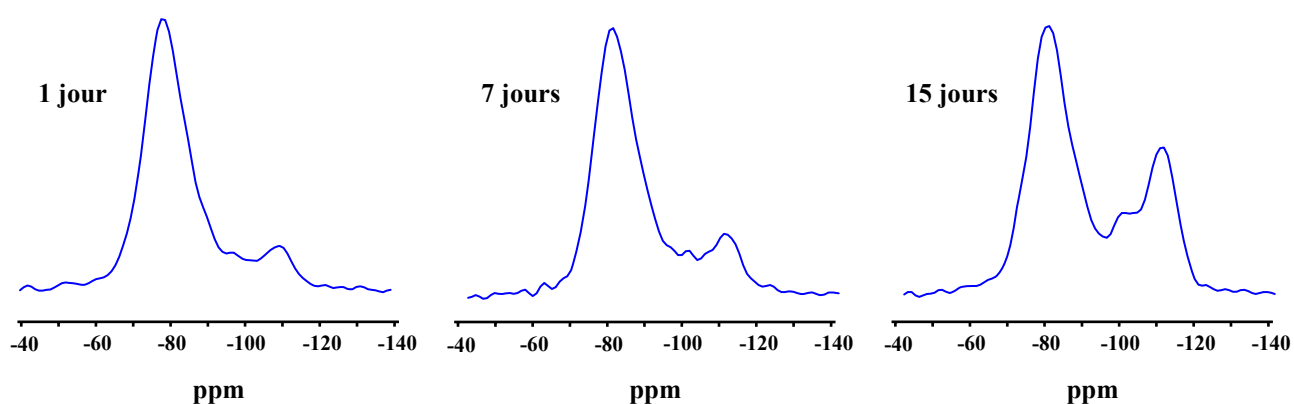
**Figure 13.6.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6Mg120 après immersion



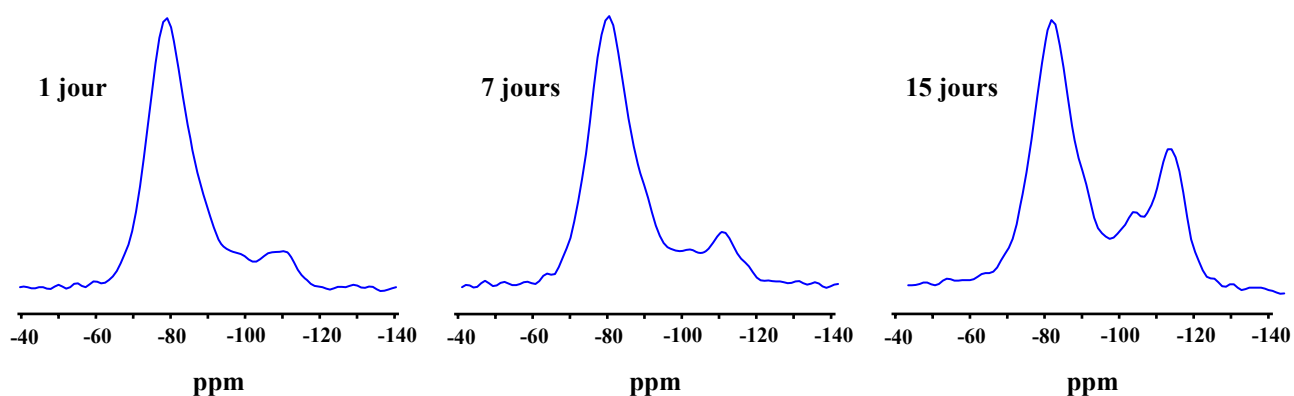
**Figure 13.7.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6Zn10 après immersion



**Figure 13.8.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6Sr10 après immersion



**Figure 13.9.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6 Os après immersion



**Figure 13.10.** Spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du verre 46S6 Sup après immersion

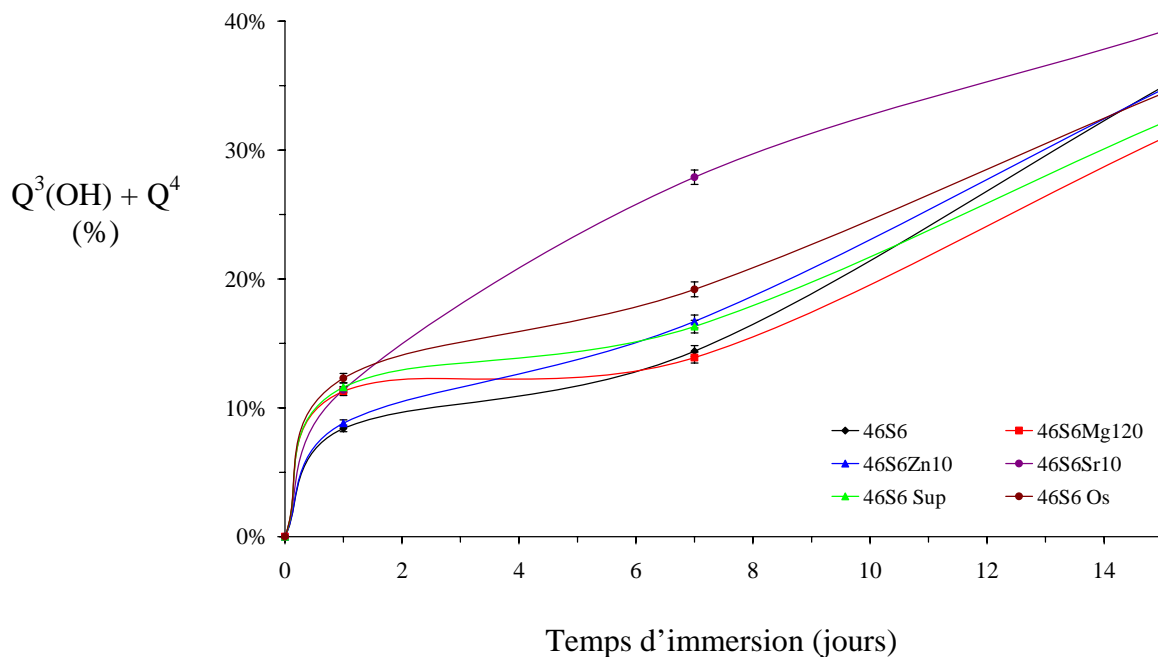
Le tableau 13.3 regroupe les résultats obtenus lors des déconvolutions des spectres  $^{29}\text{Si}$  après les différents délais d'immersion dans le SBF.

Compositions	RMN-MAS <sup>29</sup> Si : Populations ± 3% (déplacement chimique δ)									
	Q <sup>2</sup>		Q <sup>3</sup>		Q <sup>2</sup> +Q <sup>3</sup>	Q <sup>3</sup> (OH)		Q <sup>4</sup>		Q <sup>3</sup> (OH)+Q <sup>4</sup>
<b>46S6</b>										
avant immersion	80%	(-78,3 ppm)	20%	(-87,1 ppm)	<b>100%</b>					
1 jour	71%	(-78,2 ppm)	21%	(-86,5 ppm)	<b>92%</b>	2%	(-98,8 ppm)	6%	(-108,5 ppm)	<b>8%</b>
7 jours	62%	(-77,7 ppm)	24%	(-85,4 ppm)	<b>86%</b>	6%	(-100,3 ppm)	8%	(-109,4 ppm)	<b>14%</b>
15 jours	54%	(-78,3 ppm)	11%	(-87,3 ppm)	<b>65%</b>	14%	(-99,4 ppm)	21%	(-109 ppm)	<b>35%</b>
<b>46S6Mg120</b>										
avant immersion	54%	(-78,3 ppm)	33%	(-87 ppm)	<b>87%</b>					
1 jour	77%	(-77,9 ppm)	12%	(-87 ppm)	<b>89%</b>	4%	(-99,1 ppm)	7%	(-108,6 ppm)	<b>11%</b>
7 jours	72%	(-77,9 ppm)	14%	(-86,8 ppm)	<b>86%</b>	4%	(-98,8 ppm)	10%	(-108,5 ppm)	<b>14%</b>
15 jours	67%	(-77,8 ppm)	2%	(-88,6 ppm)	<b>69%</b>	7%	(-98,5 ppm)	24%	(-109,1 ppm)	<b>31%</b>
<b>46S6Zn10</b>										
avant immersion	82%	(-78,2 ppm)	18%	(-87 ppm)	<b>100%</b>					
1 jour	67%	(-78,2 ppm)	24%	(-86,1 ppm)	<b>91%</b>	3%	(-99,3 ppm)	6%	(-108,4 ppm)	<b>9%</b>
7 jours	61%	(-78,2 ppm)	22%	(-86,2 ppm)	<b>83%</b>	5%	(-99 ppm)	12%	(-108,6 ppm)	<b>17%</b>
15 jours	52%	(-78,3 ppm)	13%	(-86,9 ppm)	<b>65%</b>	11%	(-99,2 ppm)	24%	(-109 ppm)	<b>35%</b>
<b>46S6Sr10</b>										
avant immersion	79%	(-78,2 ppm)	21%	(-86,9 ppm)	<b>100%</b>					
1 jour	64%	(-78,3 ppm)	25%	(-86,5 ppm)	<b>89%</b>	4%	(-98,7 ppm)	7%	(-108,5 ppm)	<b>11%</b>
7 jours	57%	(-78,3 ppm)	15%	(-87,1ppm)	<b>72%</b>	9%	(-98,9 ppm)	19%	(-108,6 ppm)	<b>28%</b>
15 jours	56%	(-77,9 ppm)	5%	(-87,9 ppm)	<b>61%</b>	6%	(-99 ppm)	33%	(-109,4 ppm)	<b>39%</b>
<b>46S6Sup</b>										
avant immersion	83%	(-77,8 ppm)	17%	(-86,5 ppm)	<b>100%</b>					
1 jour	74%	(-78,3 ppm)	14%	(-87,6 ppm)	<b>88%</b>	5%	(-97,4 ppm)	7%	(-108,2 ppm)	<b>12%</b>
7 jours	67%	(-78,2 ppm)	17%	(-87,8 ppm)	<b>84%</b>	3%	(-99,3 ppm)	13%	(-108,9 ppm)	<b>16%</b>
15 jours	61%	(-77,7 ppm)	6%	(-86,9 ppm)	<b>67%</b>	10%	(-99,2 ppm)	22%	(-109 ppm)	<b>32%</b>
<b>46S6Os</b>										
avant immersion	80%	(-78,2 ppm)	20%	(-87 ppm)	<b>100%</b>					
1 jour	70%	(-77,9 ppm)	18%	(-86,4 ppm)	<b>88%</b>	4%	(-98,7 ppm)	8%	(-109 ppm)	<b>12%</b>
7 jours	63%	(-78,2 ppm)	18%	(-86,7 ppm)	<b>81%</b>	8%	(-98,7 ppm)	11%	(-109,1 ppm)	<b>19%</b>
15 jours	57%	(-78,1 ppm)	9%	(-86,7 ppm)	<b>66%</b>	13%	(-98,9 ppm)	21%	(-109 ppm)	<b>34%</b>

**Tableau 13.3.** Résultats de la déconvolution des spectres RMN-MAS <sup>29</sup>Si des verres après immersion dans le SBF

A l'issue des tests *in vitro*, quels que soit le délai d'immersion ou la composition du verre, quatre contributions sont observées sur les spectres RMN  $^{29}\text{Si}$ . Les espèces  $\text{Q}^2$  et  $\text{Q}^3$  sont présentes initialement dans le réseau vitreux et les espèces  $\text{Q}^3(\text{OH})$  et  $\text{Q}^4$  témoignent de la dissolution de la matrice vitreuse.

Cependant, d'après les proportions de populations, obtenues lors des déconvolutions, on constate que le taux et donc la cinétique de formation des espèces  $\text{Q}^3(\text{OH})$  et  $\text{Q}^4$  diffèrent selon les compositions étudiées. Les variations de proportions ( $\text{Q}^3(\text{OH}) + \text{Q}^4$ ) renseignent sur la réactivité chimique de nos poudres de verres, vis-à-vis du milieu d'immersion. La figure 13.11 représente l'évolution des proportions ( $\text{Q}^3(\text{OH}) + \text{Q}^4$ ) en fonction du temps d'immersion pour les différentes compositions de verres étudiées.

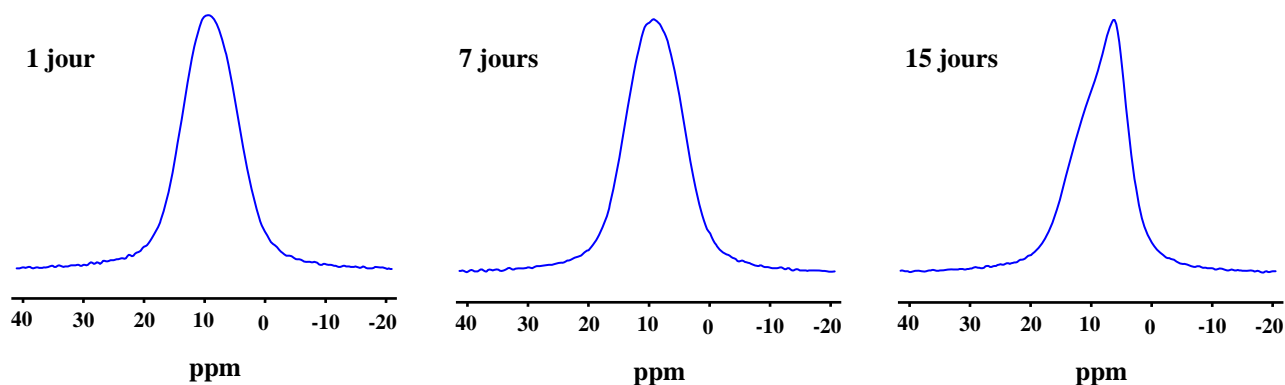


**Figure 13.11.** Evolution de la proportion  $\text{Q}^3(\text{OH}) + \text{Q}^4$  en fonction du temps d'immersion pour les différents verres étudiés

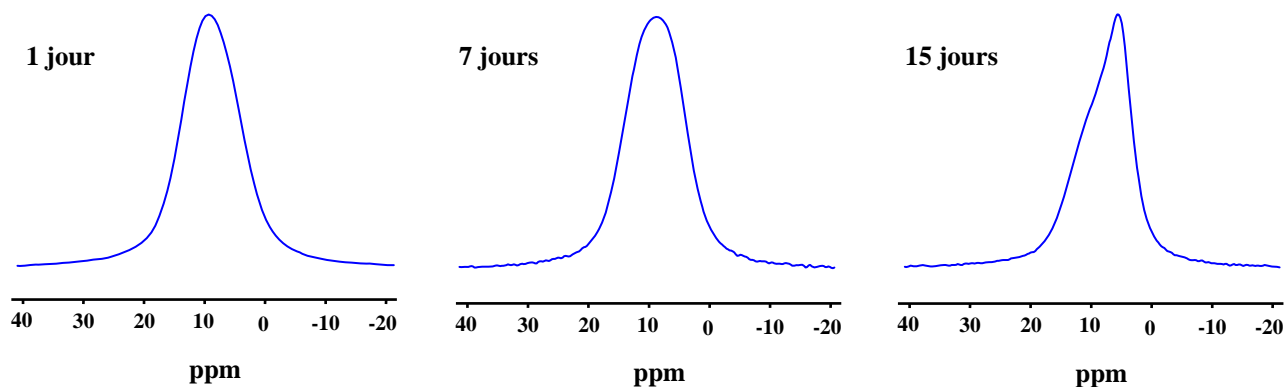
Toutes les compositions, à l'exception du verre dopé au strontium, présentent une cinétique de formation des espèces ( $\text{Q}^3(\text{OH}) + \text{Q}^4$ ) très proche. La dissolution du réseau vitreux est plus rapide pour le verre 46S6Sr10 ; l'introduction de strontium augmente ainsi la réactivité chimique des poudres de verre.

3.2. Etude par RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du 46S6

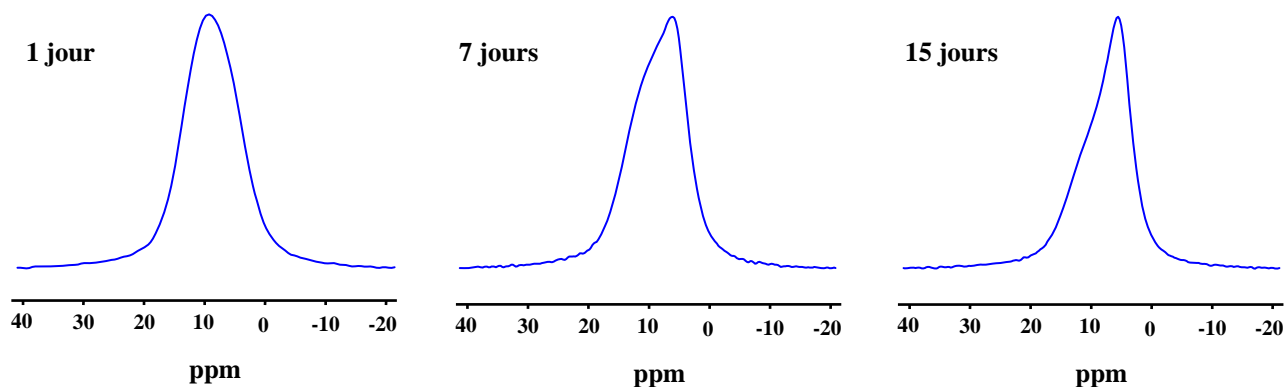
Les figures suivantes (figure 13.12 à 13.16) représentent les spectres RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  des différentes compositions de verres dopés après les différents délais d'immersion dans la SBF (de gauche à droite : 1 jour, 7 jours et 15 jours).



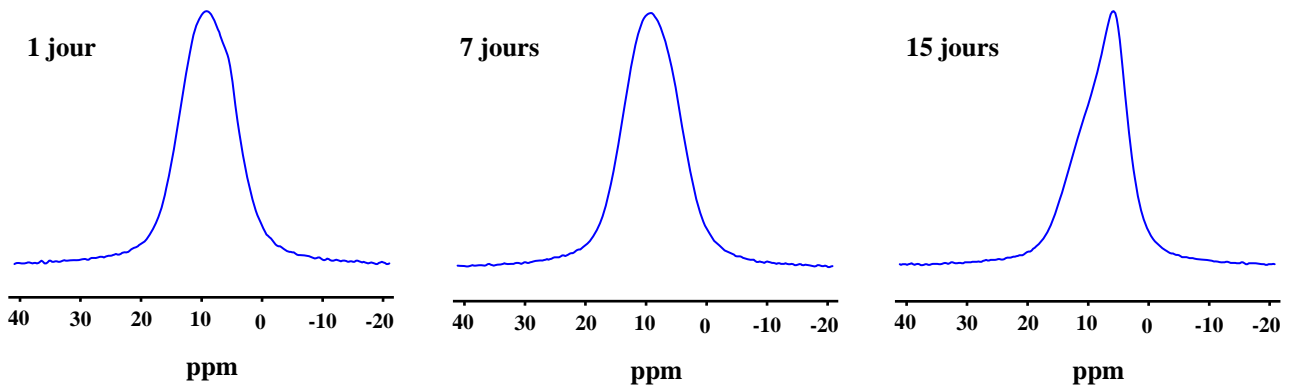
**Figure 13.12.** Spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6Mg120 après immersion



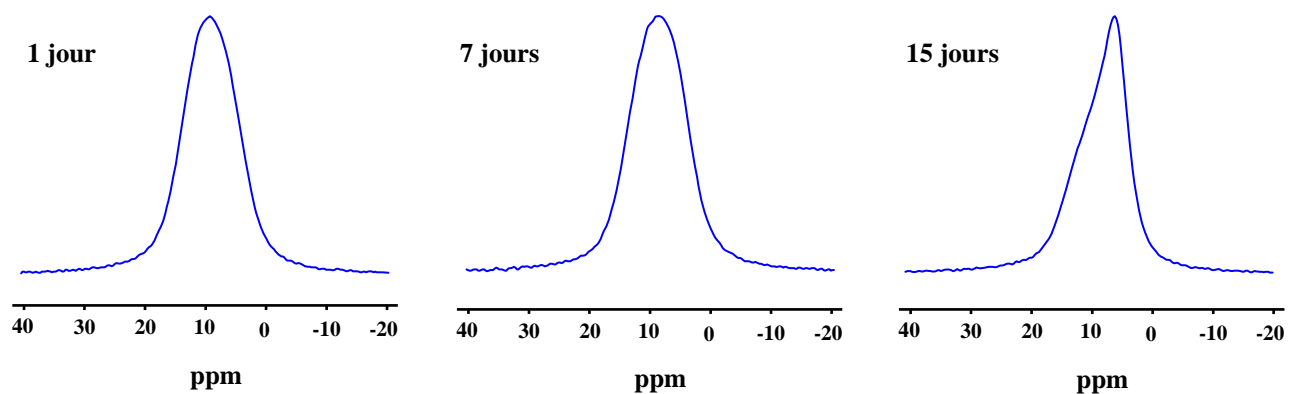
**Figure 13.13.** Spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6Zn10 après immersion



**Figure 13.14.** Spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6Sr10 après immersion



**Figure 13.15.** Spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6 Sup après immersion



**Figure 13.16.** Spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du verre 46S6 Os après immersion

Le tableau 13.4 regroupe les résultats obtenus lors des déconvolutions des spectres  $^{31}\text{P}$  après les différents délais d'immersion dans le SBF. Pour toutes les compositions étudiées, on observe à l'issue de tests *in vitro*, l'apparition de la composante à environ 3,5 ppm, caractéristique de la formation de la couche d'hydroxyapatite à la surface des verres. Cependant, la quantité d'hydroxyapatite formée à l'issue des 15 jours d'immersion varie en fonction des éléments introduits dans la matrice vitreuse.

La figure 13.17 représente l'évolution de la proportion de la raie  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$  en fonction du temps d'immersion pour les différentes compositions de verres étudiées. La proportion de cette contribution diffère également selon les compositions étudiées et selon le temps d'immersion dans le SBF. Les variations de proportions de cette composante renseignent sur la cinétique de formation de la couche d'hydroxyapatite en milieu physiologique simulé.

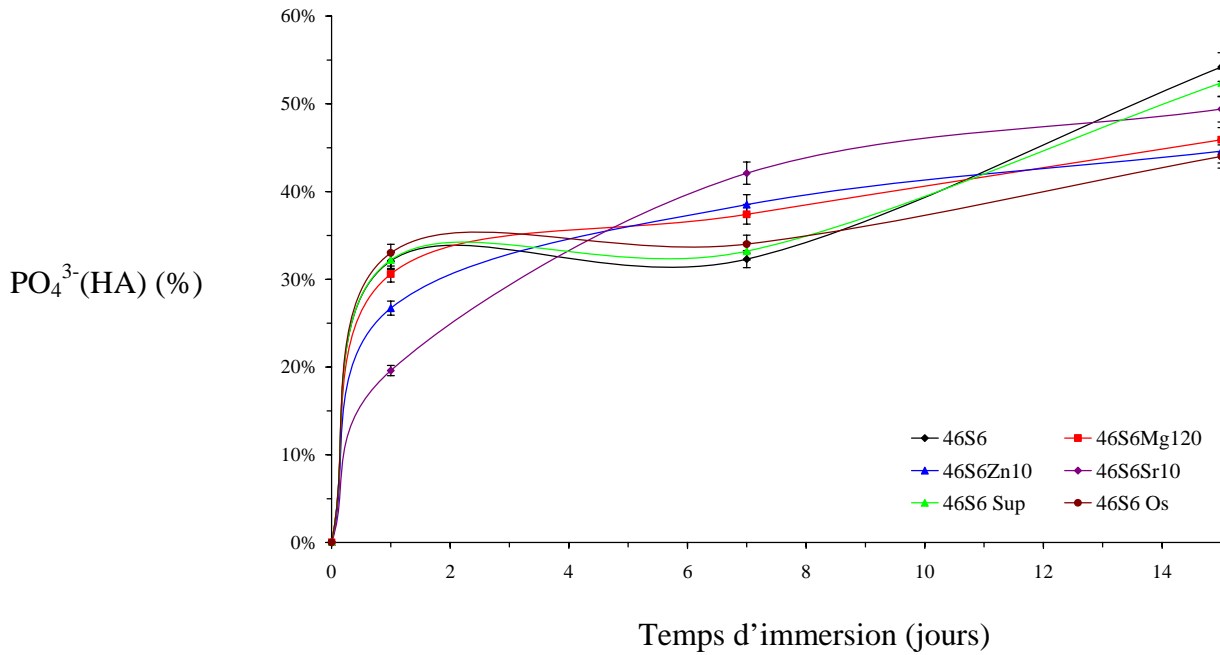


Compositions	RMN $^{31}\text{P}$ : Populations $\pm 3\%$ (déplacement chimique $\delta$ )			
	$\text{PO}_4^{3-}$		$\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$	
<b>46S6</b>				
avant immersion	100%	(8,6 ppm)		
1 jour	68%	(8,5 ppm)	32%	(3,6 ppm)
7 jours	68%	(8,5 ppm)	32%	(3,4 ppm)
15 jours	46%	(8,3 ppm)	54%	(3,5 ppm)
<b>46S6Mg120</b>				
avant immersion	95,4%	(7,9 ppm)		
1 jour	69%	(8,6 ppm)	31%	(3,8 ppm)
7 jours	63%	(8,5 ppm)	37%	(4,1 ppm)
15 jours	54%	(8 ppm)	46%	(3,5 ppm)
<b>46S6Zn10</b>				
avant immersion	100%	(7,5 ppm)		
1 jour	73%	(8,4 ppm)	27%	(3,6 ppm)
7 jours	62%	(8,4 ppm)	38%	(3,8 ppm)
15 jours	55%	(8,6 ppm)	45%	(3,5 ppm)
<b>46S6Sr10</b>				
avant immersion	100%	(7,3 ppm)		
1 jour	80%	(8,2 ppm)	20%	(3,7 ppm)
7 jours	58%	(8,6 ppm)	42%	(3,6 ppm)
15 jours	51%	(8,1 ppm)	49%	(3,6 ppm)
<b>46S6Sup</b>				
avant immersion	100%	(8,5 ppm)		
1 jour	68%	(8,4 ppm)	32%	(3,7 ppm)
7 jours	67%	(8,5 ppm)	33%	(3,7 ppm)
15 jours	48%	(7,9 ppm)	52%	(3,6 ppm)
<b>46S6Os</b>				
avant immersion	100%	(8,5 ppm)		
1 jour	67%	(8,5 ppm)	33%	(4,3 ppm)
7 jours	66%	(8,3 ppm)	34%	(3,6 ppm)
15 jours	56%	(8 ppm)	44%	(3,5 ppm)

**Tableau 13.4.** Résultats de la déconvolution des spectres  $^{31}\text{P}$  des verres après immersion dans le SBF

Quelle que soit la composition étudiée, la formation d'apatite n'est pas linéaire en fonction du temps d'immersion. D'une manière générale, on observe une formation rapide dès le premier jour d'immersion, avec 20 à 30% d'espèces  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$  formées. Entre 1 et 15 jours, la proportion d'espèces  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$  continue d'augmenter, mais la cinétique de formation est plus lente. Selon, les compositions, à l'issue des 15 jours d'immersion, on atteint une proportion de  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$  comprise entre 44 et 54%.

Enfin, le verre dopé au strontium présente là encore un comportement original par rapport aux autres compositions. La cinétique de formation de l'hydroxyapatite est plus rapide entre 1 et 7 jours d'immersion pour le 46S6Sr10.



**Figure 13.17.** Evolution de la proportion d'espèces  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$  en fonction du temps d'immersion pour les différents verres étudiés

#### 4. Bilan des modifications structurales lors des tests *in vitro*

La caractérisation par RMN-MAS du solide des verres, à l'issue des tests *in vitro*, a permis d'observer les modifications structurales induites par le processus de bioactivité. Cette étude constitue une approche originale de la compréhension des mécanismes de ce processus.

Après immersion, la RMN du  $^{29}\text{Si}$  indique que le silicium présente quatre types d'environnement tétraédrique. Les espèces  $\text{Q}^2$  et  $\text{Q}^3$  sont présentes initialement dans le verre, puis avec l'augmentation du temps d'immersion, la proportion globale ( $\text{Q}^2 + \text{Q}^3$ ) diminue au profit de l'apparition des deux nouvelles espèces  $\text{Q}^3(\text{OH})$  et  $\text{Q}^4$ . La présence de ces nouvelles espèces témoigne donc de la dissolution du réseau vitreux. Une majorité des groupements silanols formés se repolymérisent ensuite immédiatement à la surface du verre pour former une couche riche en silice  $\text{SiO}_2$ . L'analyse par RMN  $^{31}\text{P}$  permet d'observer l'apparition d'une nouvelle composante, notée  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$  et située à environ 3,5 ppm. Cette contribution est attribuée à la couche d'hydroxyapatite qui se développe lors des tests *in vitro*.

La majorité des verres dopés présentent une cinétique de dissolution de la matrice vitreuse et de formation de l'hydroxyapatite très proche de celle observée pour le verre de référence 46S6. Le verre dopé au strontium présente néanmoins un comportement original. En effet, l'introduction de strontium augmente significativement la réactivité chimique des poudres de verre et la cinétique de formation de l'hydroxyapatite est plus rapide entre 1 et 7 jours d'immersion pour cette composition.

## Chapitre 14

### Analyses des échantillons sur poudre après immersion

Les poudres de verre caractérisées par RMN-MAS du solide, après immersion, ont également été analysées par spectroscopie d'absorption infrarouge et observées par microscopie électronique à balayage. Les solutions de SBF, après les différents délais d'immersion, ont quant à elles été analysées par ICP-OES.

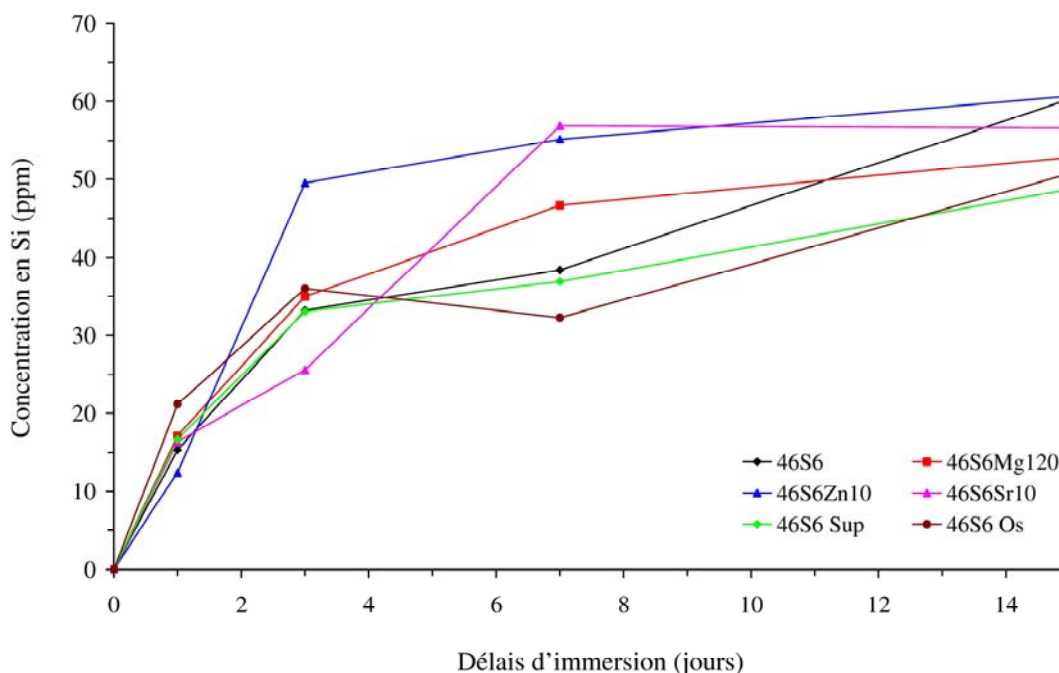
Ces études ont pour but de compléter les résultats obtenus par RMN-MAS du solide et d'évaluer les différences de réactivité chimique et de bioactivité entre les poudres et les matériaux massifs de même composition.

#### 1. Analyse par ICP-OES du SBF après immersion

Les figures 14.1 à 14.3 présentent respectivement l'évolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans les solutions de SBF après les différents délais d'immersion. Les courbes représentées correspondent chacune à une des compositions de poudre étudiées par RMN du solide. Notons que les barres d'erreur sont trop petites pour pouvoir être visibles sur la figure 14.1.

D'une manière générale, les courbes des différentes compositions suivent les mêmes tendances d'évolution. Ainsi, quelle que soit la composition, on observe une augmentation de la teneur en silicium et en calcium dans le SBF en fonction du temps d'immersion des poudres. A l'inverse, la concentration en phosphore diminue en fonction du temps d'immersion, jusqu'à atteindre une valeur quasiment nulle.

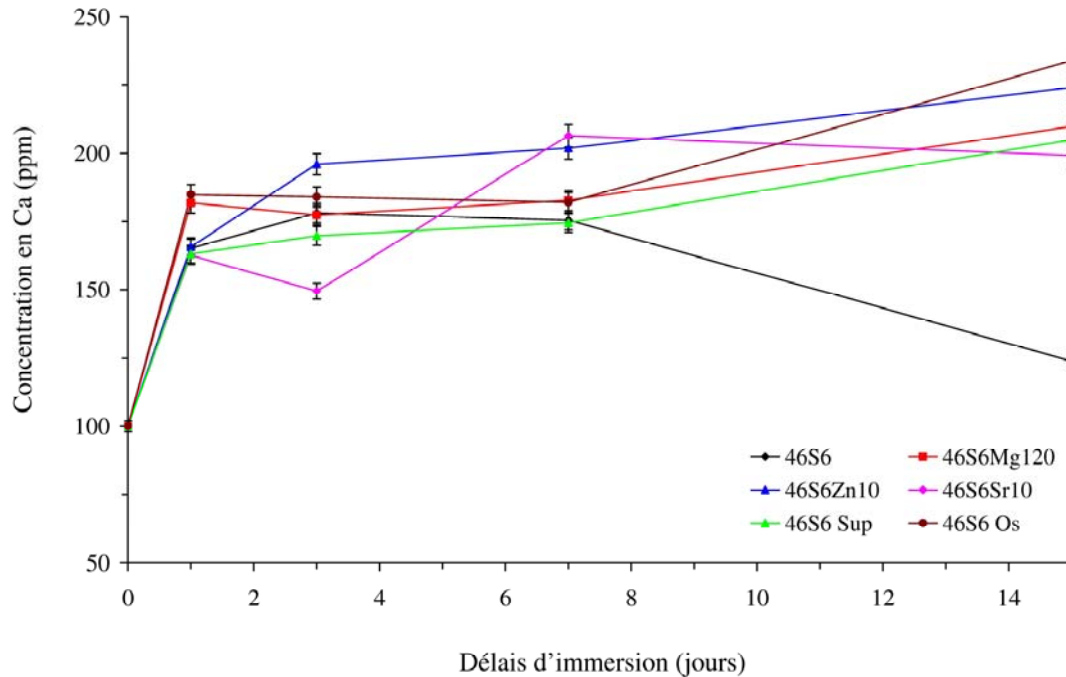
Seul le verre dopé en strontium présente un comportement original du point des échanges ioniques ; pour rappel, ce comportement original du strontium a été également observé lors de l'étude des poudres par RMN du solide après immersion (Chapitre 13).



**Figure 14.1.** Concentration en Si dans le SBF en fonction du temps d'immersion

Le relargage de silicium du verre vers le milieu d'immersion est cohérent avec la dissolution du réseau vitreux. Ce dernier a lieu de manière importante pendant les trois premiers jours d'immersion, puis le phénomène ralentit, jusqu'à atteindre un état d'équilibre (figure 14.1).

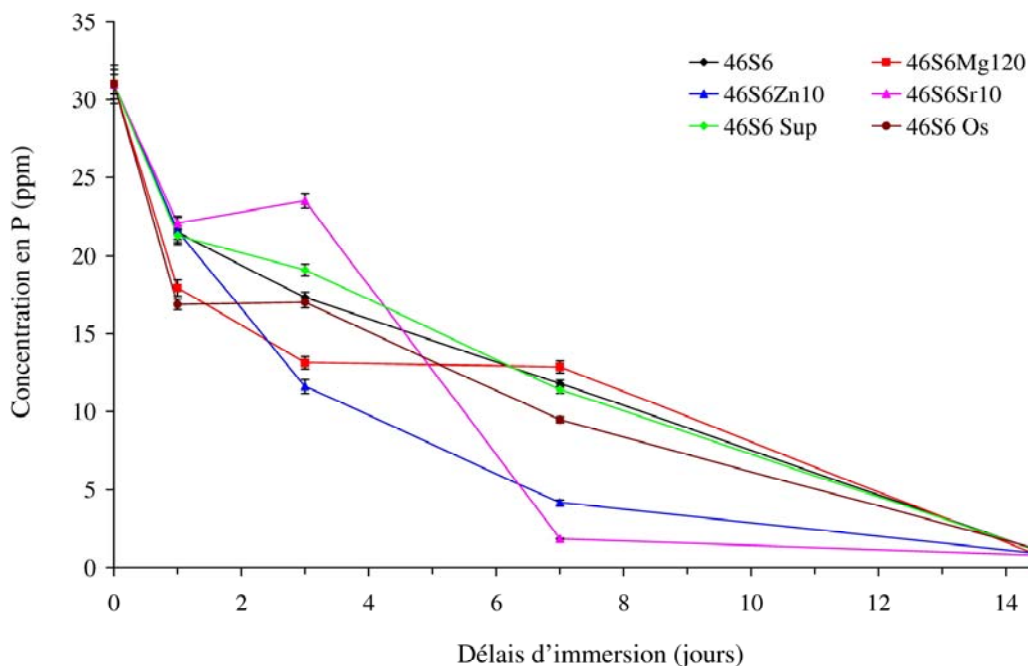
Cette observation peut être corrélée avec la croissance de la couche riche en silice à la surface des verres. En effet, entre 3 et 15 jours d'immersion, la majorité des groupements SiOH ne sont plus relargués vers le milieu d'immersion, mais se recombinent en surface pour former une couche riche en silice. Ce phénomène est confirmé par l'analyse des poudres après immersion par RMN  $^{29}\text{Si}$ , avec l'augmentation importante de la proportion en espèces  $\text{Q}^4$  dans le réseau vitreux. On en conclut que le relargage de silicium a lieu uniquement pendant les premières heures d'immersion ; au-delà de 3 jours d'immersion, un état d'équilibre est atteint grâce au développement de la couche riche en silice, qui stabilise le relargage des groupements silanols SiOH dans le SBF.



**Figure 14.2.** Concentration en Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion

L'évolution des concentrations en calcium et en phosphore est liée à la formation de la couche d'hydroxyapatite en surface, lors de l'immersion des poudres de verres bioactifs.

L'important relargage de calcium durant le premier jour d'immersion (de 60 à 80 ppm selon les compositions) correspond à la désalcalinisation de la surface du verre, première étape du processus de bioactivité (Chapitre 11). La concentration en calcium tend ensuite à se stabiliser entre 1 et 7 jours d'immersion, puis au-delà de 7 jours, on observe son augmentation ou sa diminution selon les compositions étudiées (figure 14.2). Entre 1 et 7 jours d'immersion, le calcium contenu dans la matrice vitreuse continue de migrer vers la surface des verres. Seulement, ce dernier n'est plus relargué vers le milieu, mais il est utilisé pour former la couche de phosphate de calcium qui se développe à la surface de verres bioactifs. Selon la bioactivité des compositions étudiées, le calcium provenant de la matrice vitreuse va être présent en quantité suffisante ou non pour assurer la croissance de la couche riche en phosphate de calcium. Ainsi, on constate que pour le 46S6, la concentration en calcium dans le SBF diminue entre 7 et 15 jours ; ceci signifie que le calcium n'est pas fourni en quantité suffisante par la matrice vitreuse pour assurer la croissance optimale de la couche de phosphate de calcium. Cette dernière va donc utiliser le calcium contenu dans le SBF pour assurer son développement, d'où la diminution de la concentration en calcium observée.

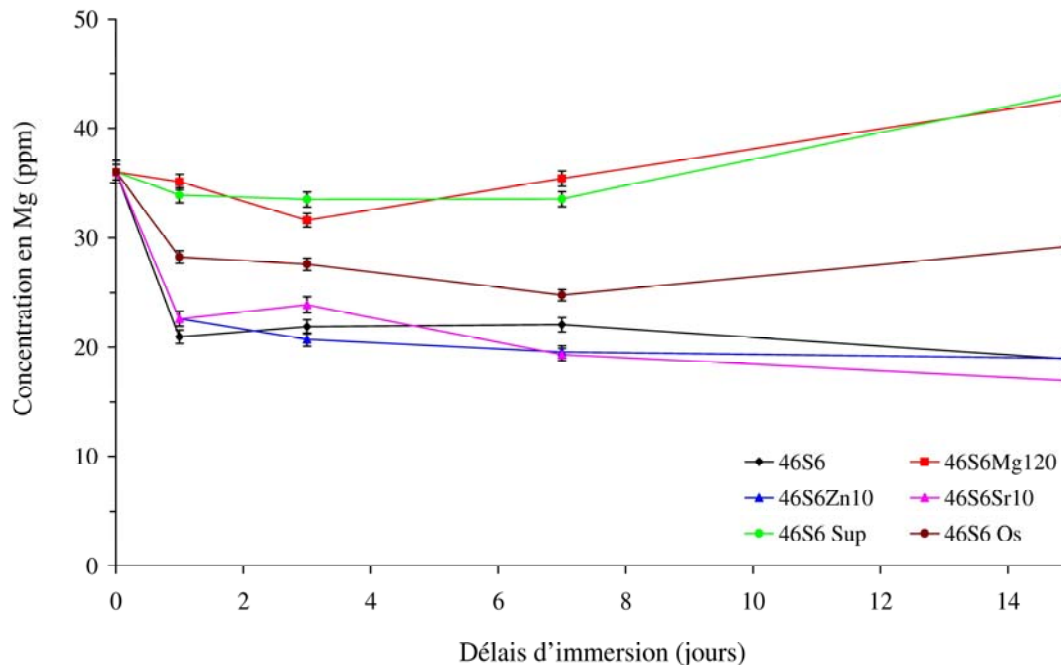


**Figure 14.3.** Concentration en P dans le SBF en fonction du temps d'immersion

De la même manière, dès le premier jour d'immersion, on observe une forte diminution de la concentration en phosphore quelle que soit la composition étudiée (figure 14.3). Pour rappel, les spectres obtenus par RMN du  $^{31}\text{P}$  indiquent, dès le début de l'immersion, la présence du phosphore dans un environnement orthophosphate, caractéristique de l'hydroxyapatite. La concentration en phosphore diminue donc dans les solutions de SBF, car ce dernier est utilisé pour former la couche de phosphate de calcium en surface des verres. Selon les compositions, la cinétique de diminution de la concentration en phosphore varie, cependant à l'issue des 15 jours d'immersion, la concentration en phosphore est nulle dans le SBF, quelle que soit la composition (figure 14.3). Tout le phosphore présent initialement dans la solution de SBF a donc été utilisé pour former la couche d'hydroxyapatite.

Concernant les éléments introduits dans la matrice vitreuse, plusieurs comportements ont été remarqués. Dans tous les cas, aucun relargage de zinc n'a été observé quel que soit le temps d'immersion dans le SBF. A l'inverse, un relargage en strontium a été mesuré dans le SBF contenant les poudres de verres 46S6Sr10 et 46S6 Sup. Ces relargages ne sont observés que pour les verres les plus riches en strontium (0,1 %) et atteignent une valeur de l'ordre du ppm après 15 jours d'immersion.

Les variations de la concentration en magnésium sont beaucoup plus importantes et sont représentées sur la figure 14.4. On distingue trois types d'évolution selon la teneur en magnésium dans la matrice vitreuse. Ainsi pour les verres ne contenant pas de magnésium, on observe une diminution d'environ 15 ppm de la concentration en magnésium pendant le premier jour d'immersion. Entre 1 et 15 jours, elle tend à se stabiliser mais suit néanmoins une légère diminution (moins de 5 ppm). Les verres contenant 1,2% de magnésium présentent un comportement différent. En effet, jusqu'à 7 jours d'immersion, la concentration en magnésium varie très peu de sa teneur initiale dans le SBF, puis elle augmente entre 7 et 15 jours d'immersion. Enfin, le verre 46S6 Os, contenant 0,5% de magnésium, présente un comportement intermédiaire aux deux précédents.



**Figure 14.4.** Concentration en Mg dans le SBF en fonction du temps d'immersion

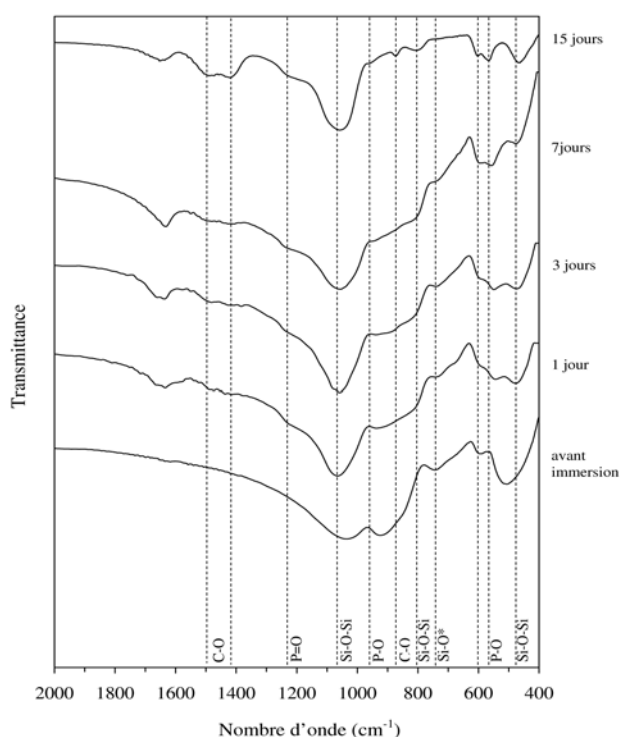
Ces variations de la concentration en magnésium confirment le rôle important joué par ce dernier dans le processus de bioactivité, et plus particulièrement lors de la formation de l'hydroxyapatite. Ainsi, lorsque le magnésium est présent en quantité suffisante dans la matrice vitreuse, il est utilisé préférentiellement à celui contenu dans le SBF. Dans le cas contraire, comme en atteste les diminutions de sa concentration observées pour les verres 46S6, 46S6Zn10, 46S6Sr10 et 46S6 Os, le magnésium contenu dans le SBF est utilisé. Finalement, une teneur de 0,5% de magnésium dans la composition du verre n'est pas suffisante pour le développement de la couche d'hydroxyapatite.



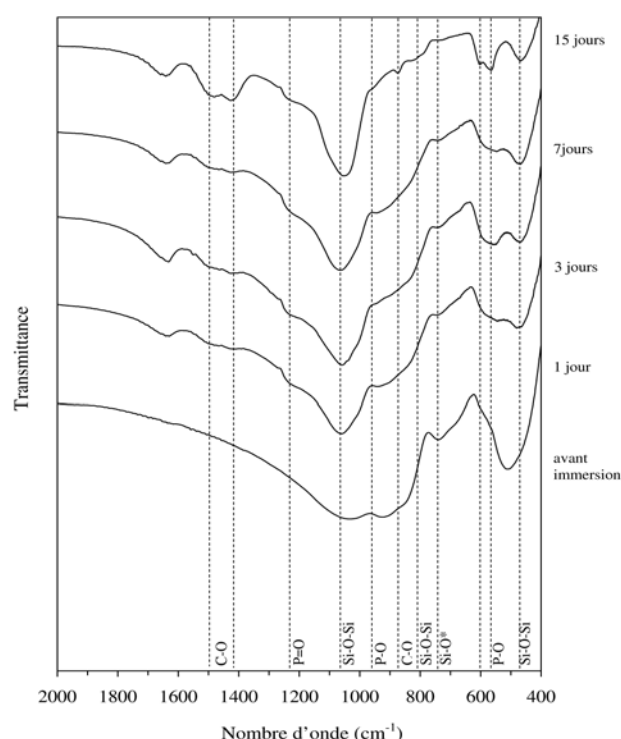
## 2. Caractérisations des poudres après immersion

### 2.1. Analyse par spectroscopie d'absorption infrarouge

Les spectres obtenus par spectroscopie d'absorption infrarouge présentent peu de différences par comparaison à ceux présentés sur échantillons massifs (Chapitres 6 à 10). La contribution de la matrice vitreuse est naturellement plus visible, puisque l'ensemble de la poudre de verre a été analysée, au lieu de la couche grattée en surface. De plus, d'un échantillon à l'autre, l'évolution spectrale avec le temps d'immersion est semblable (figures 14.5 à 14.10).

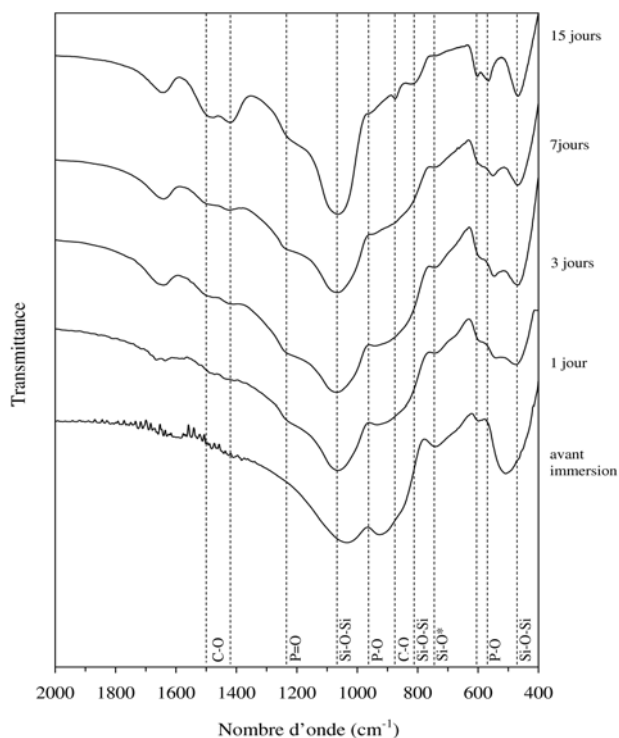


**Figure 14.5.** IR de la poudre de verre 46S6 après différents délais d'immersion

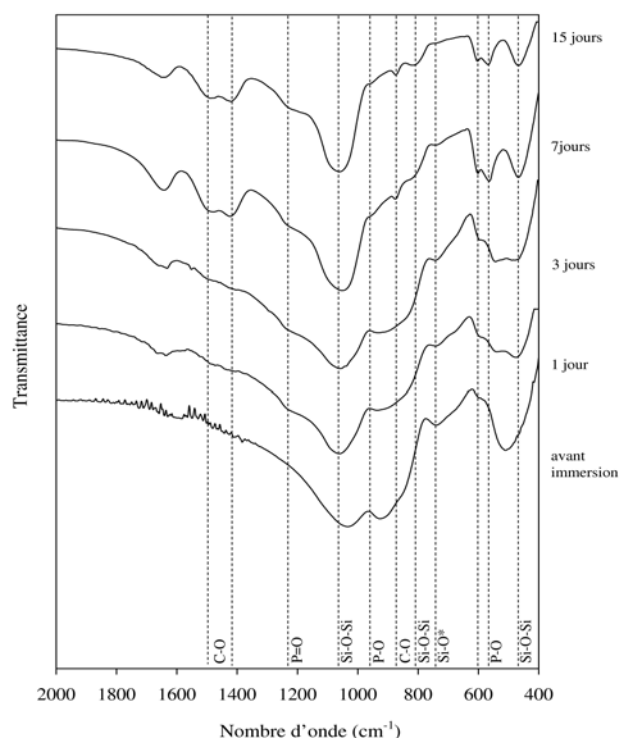


**Figure 14.6.** IR de la poudre de verre 46S6Mg120 après différents délais d'immersion

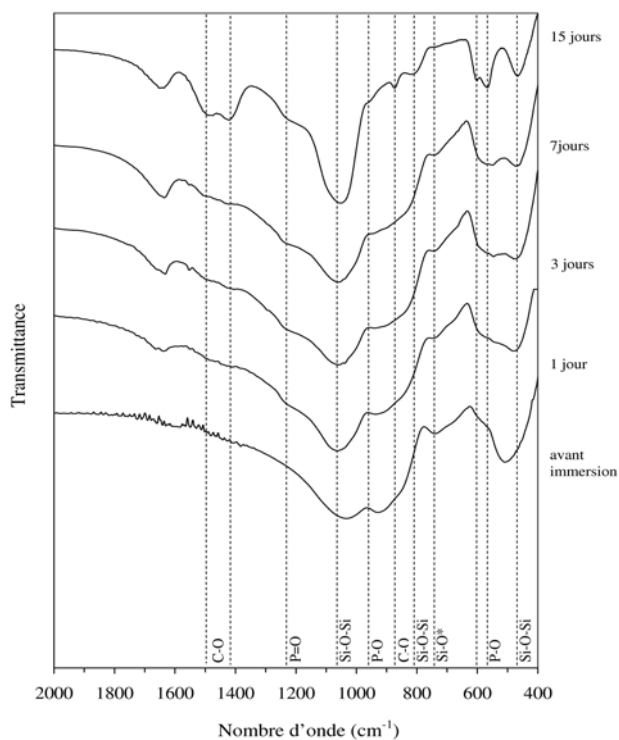
Après 15 jours d'immersion, la présence sur les spectres des trois bandes P-O à 565, 603 et 961  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristiques des phosphates en phase cristalline, confirment la formation d'une couche d'hydroxyapatite. De plus, cette hydroxyapatite est carbonatée comme le montre les bandes C-O à 873, 1420 et 1470  $\text{cm}^{-1}$ . Ces spectres présentent également deux bandes Si-O-Si à 470 et 1075  $\text{cm}^{-1}$ , confirmant la présence d'une sous-couche riche en  $\text{SiO}_2$ . La bande Si-O à environ 745  $\text{cm}^{-1}$ , notée Si-O\*, est caractéristique quant à elle de la matrice vitreuse.



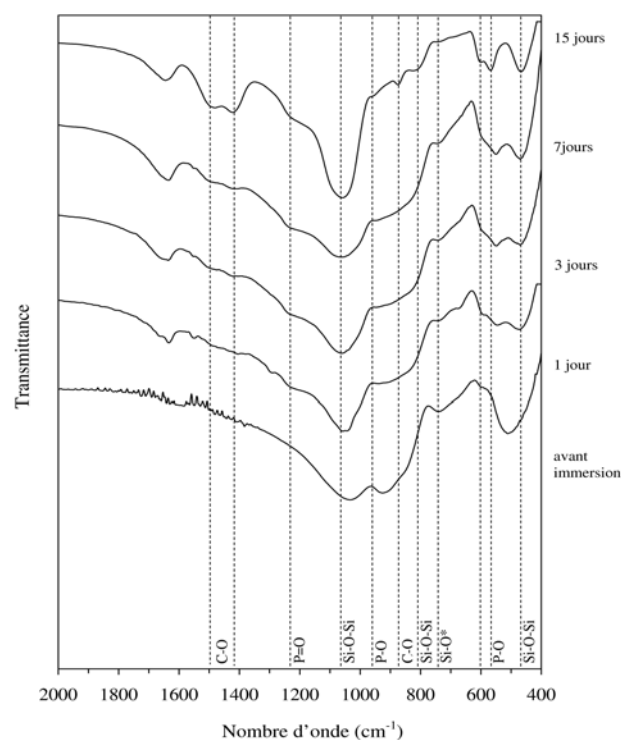
**Figure 14.7.** IR de la poudre de verre 46S6Zn10 après différents délais d'immersion



**Figure 14.8.** IR de la poudre de verre 46S6Sr10 après différents délais d'immersion



**Figure 14.9.** IR de la poudre de verre 46S6 Sup après différents délais d'immersion

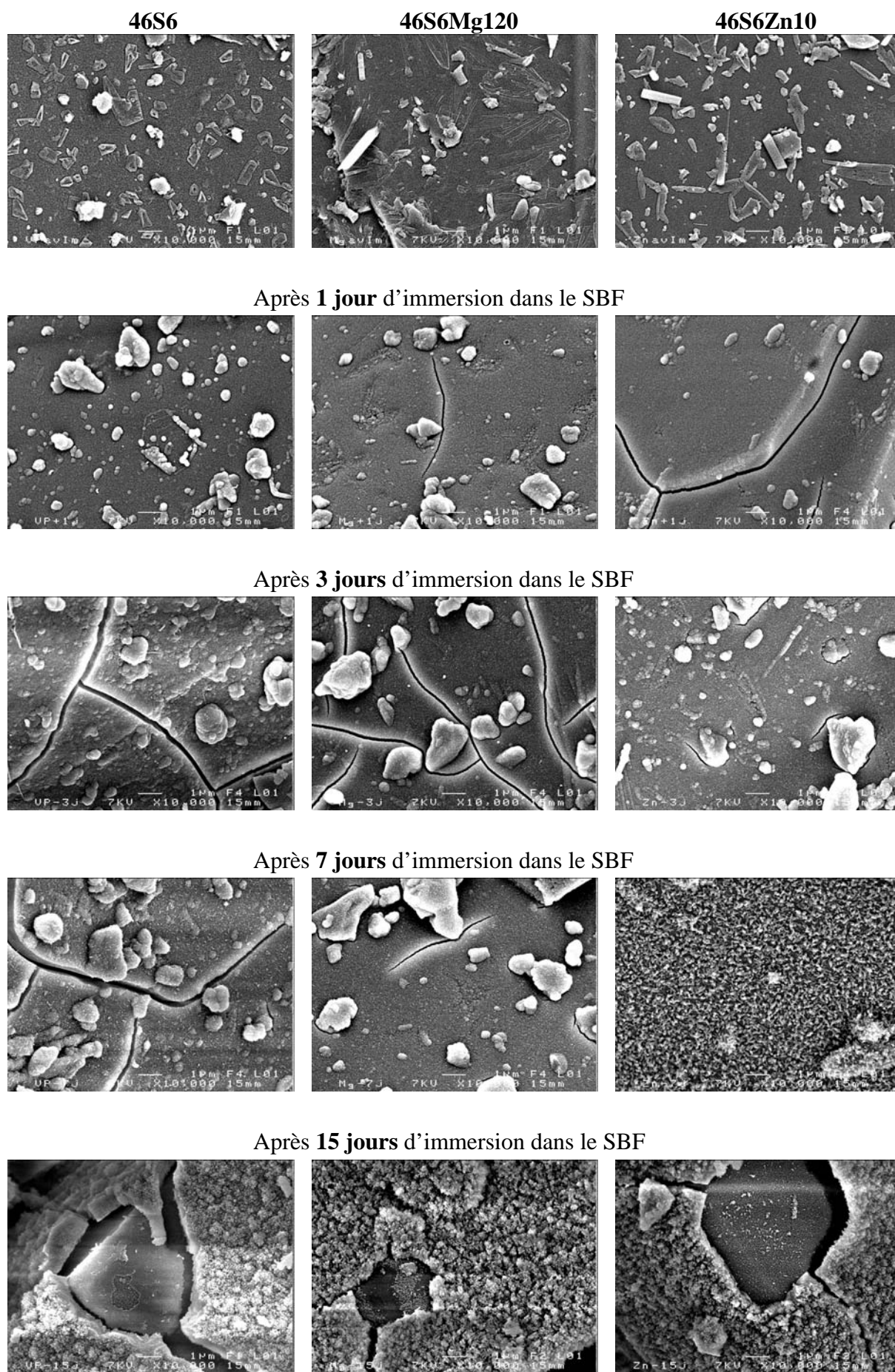


**Figure 14.10.** IR de la poudre de verre 46S6 Os après différents délais d'immersion

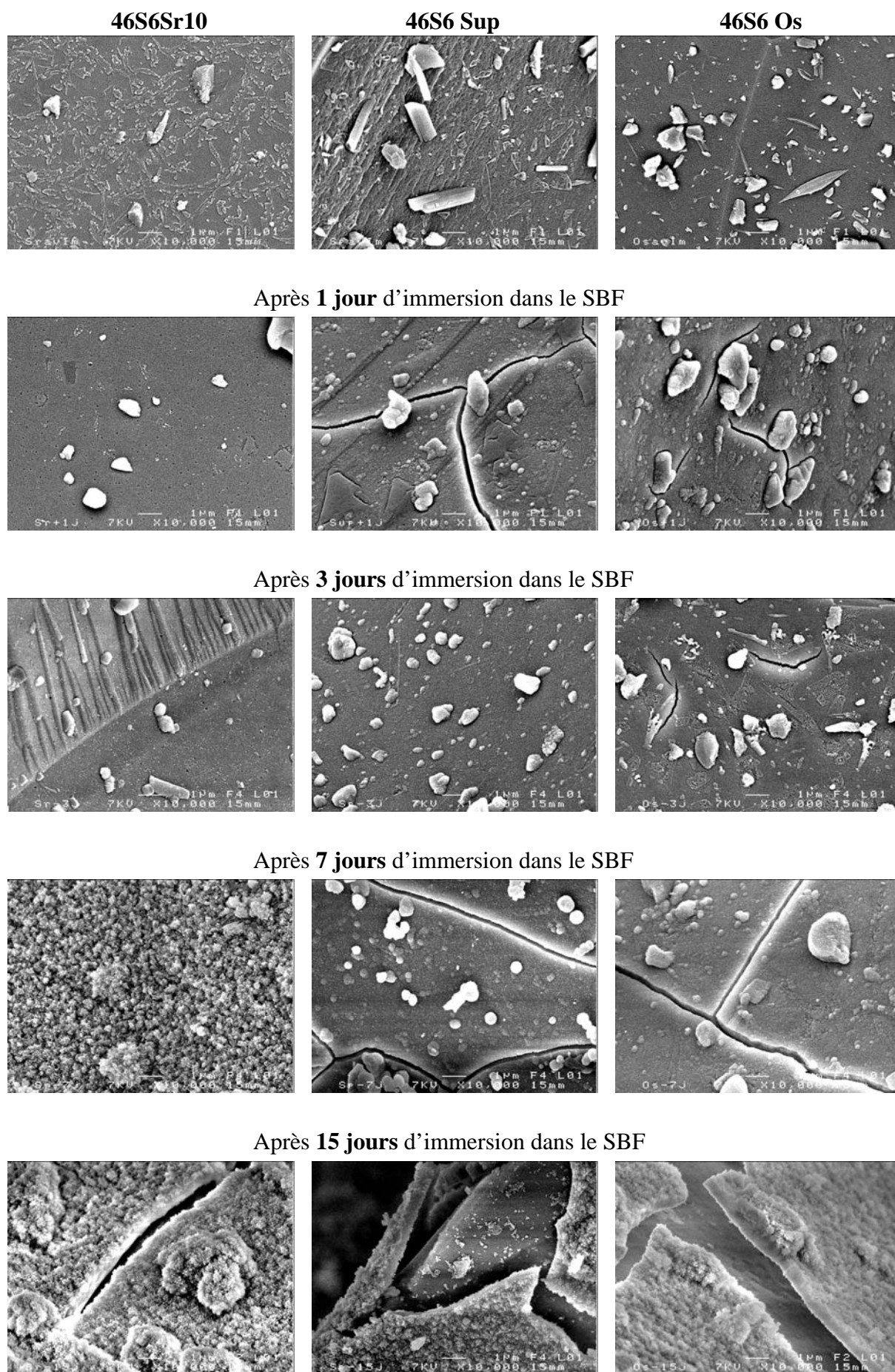
## 2.2. Observation de la surface des poudres par MEB

Les figures 14.11 et 14.12 présentent la surface des poudres de verres au grossissement  $\times 10.000$  avant et après les différents délais d'immersion dans le SBF. On observe la modification de la surface des verres au fur et à mesure que le temps d'immersion augmente. La présence de craquelures, formées lors du séchage des échantillons, met en évidence la formation d'une couche sur le verre.

Dès 7 jours d'immersion, les cristaux d'hydroxyapatite sont observables à la surface du 46S6Zn10 et du 46S6Sr10. Par contre, pour les autres compositions, il faut attendre 15 jours avant de pouvoir les observer. A l'issue des 15 jours, la couche d'hydroxyapatite se détache très nettement de la surface du verre, quelle que soit la composition observée ; son épaisseur est comprise entre 500 nm et 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure 14.11.** Observation au MEB de la surface des poudres de verre ( $G \times 10.000$ )



**Figure 14.12.** Observation au MEB de la surface des poudres de verre (G  $\times 10.000$ )

### 3. Bilan des résultats obtenus et intérêt de l'étude sur poudre

Les évolutions des concentrations en silicium, calcium et phosphore sont en accord avec les résultats obtenus par RMN-MAS du solide dans le chapitre précédent. La formation d'espèces  $Q^3(OH)$  et  $Q^4$ , et ainsi la formation de la couche riche en silice, peuvent être corrélées avec la stabilisation de la concentration en silicium dans le SBF. De même, l'apparition de la composante, caractéristique de l'hydroxyapatite, sur les spectres RMN en  $^{31}P$ , et la diminution de la concentration en phosphore, confirment la formation d'une couche d'hydroxyapatite à la surface des verres.

Un relargage de strontium a été observé pour les deux compositions contenant 0,1% de cet élément ; les verres contenant du magnésium ont montré un comportement différent dans l'évolution de la concentration de cet élément, par rapport à ceux qui n'en contenait pas. Ainsi, le magnésium présent dans la matrice vitreuse joue un rôle dans le processus de bioactivité et plus particulièrement, lors de la formation de l'hydroxyapatite.

Concernant l'étude par infrarouge, on retrouve sur les spectres les bandes déjà observées dans les chapitres précédents et peu de différences entre les compositions de verre. La formation de cristaux d'hydroxyapatite est confirmée par les observations au MEB. Le développement des cristaux débute après 7 jours d'immersion à la surface des verres dopés au zinc et au strontium. Après 15 jours d'immersion, la couche d'hydroxyapatite se détache nettement de la surface des verres, quelle que soit la composition.

Comparativement aux résultats obtenus lors des tests in vitro sur échantillons massifs, les principales différences sont observées sur les analyses ICP et les micrographies de la surface des échantillons. En effet, les poudres présentant une surface spécifique plus grande (estimée par BET à  $0,3 \text{ m}^2/\text{g}$ ), les échanges ioniques ont lieu de manière plus rapide et plus intense à l'interface verre bioactif / SBF. Ainsi, le processus de bioactivité est accéléré et on assiste à la formation et la cristallisation précoce de la couche d'hydroxyapatite. Enfin, la morphologie des cristaux formés à la surface des poudres est proche de celle sur échantillons massifs avec un dépôt de particules en forme d'aiguilles. Cependant, sur poudre, la taille des cristaux est fortement diminuée.



# PARTIE 5

## **Etudes biologiques**





## **Chapitre 15**

### **Evaluation *in vitro* des verres en présence de cellules**

L'étude *in vitro* en présence de cellules de nos verres s'est déroulée en deux parties. La première phase de cette étude a été réalisée lors d'un stage de recherche, effectué dans le cadre d'une collaboration avec l'école Polytechnique de Montréal. Cette étude a eu lieu à l'Institut de Cardiologie de Montréal. La seconde partie a été effectuée en collaboration avec les biologistes de notre équipe, de la faculté d'Odontologie de Rennes.

Les biomatériaux placés en contact avec des tissus vivants peuvent être à l'origine des effets toxiques provoqués par le matériau lui-même ou par ses produits de dégradation sur les cellules par contact direct ou indirect. L'étude de cytotoxicité, avec l'utilisation de techniques de culture cellulaire, permet ainsi de déterminer la lyse cellulaire (mort cellulaire), l'inhibition de la croissance cellulaire et les autres effets sur les cellules engendrés par les matériaux ou leurs extraits [137].

#### **A. Etude réalisée sur matériaux massifs**

##### **1. Evaluation de la cytotoxicité des verres bioactifs**

###### **Tests préliminaires sur poudres**

Il existe plusieurs méthodes d'études de la cytotoxicité. Dans cette première partie, le test MTT (3-(4,5dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) a été utilisé. Il s'agit d'une méthode rapide de numération des cellules vivantes, après traitement par les extraits des différents matériaux. La méthode de contact indirect a été choisie afin de réduire les risques de dommages mécaniques provoqués par les matériaux mis directement en contact avec les cellules et estimer les effets des produits de relargage (dégradation) des matériaux [138-139].

## 1.1. Protocole expérimental

Lors de cette première étude, la cytotoxicité des verres bioactifs a été évaluée sur quatre compositions ; il s'agit du 46S6, du 46S6Mg120, du 46S6Zn10 et du 46S6Sr10. Les matériaux ont été mis sous forme de poudre. Deux granulométries ont été préparées : entre 40 et 63  $\mu\text{m}$  et entre 500 et 600  $\mu\text{m}$  de diamètre, obtenues après broyage et tamisage du verre brut de fusion.

### 1.1.1. Méthode de stérilisation

Les échantillons ont été stérilisés à l'oxyde d'éthylène (EtO). Cette méthode de stérilisation à basse température est l'une des principales méthodes pour la stérilisation des matériaux prothétiques et elle est active contre tous les micro-organismes connus, sauf les prions. L'oxyde d'éthylène est une molécule de petite taille (plus petite qu'une molécule d'eau ou de formaldéhyde), expliquant son pouvoir de pénétration important. L'absorption rapide de l'oxyde d'éthylène par la plupart des matières plastiques implique la nécessité d'une bonne tenue de l'objet à stériliser. Les limites de la stérilisation à l'oxyde d'éthylène sont les suivantes : la toxicité de cette substance exige des mesures de protection pour le personnel et des cycles spéciaux de dégazage.

La stérilisation a été effectuée dans un stérilisateur 3M<sup>TM</sup> Steri-Vac<sup>TM</sup>, suivant un cycle d'exposition au gaz d'une durée de 4h. Les échantillons ont ensuite été soumis à une aération pendant 5 jours afin d'éviter tous risques de toxicité liés aux résidus d'oxyde d'éthylène.

### 1.1.2. Méthode d'extraction

Il convient que les conditions d'extraction simulent ou exagèrent les conditions d'utilisation clinique du matériau, afin de définir le danger potentiel de toxicité, sans induire de modifications significatives pour le matériau d'essai telles qu'une fusion, un ramollissement ou une altération de sa structure chimique. L'extraction est un processus complexe influencé par la durée, la température, le rapport masse/volume, le milieu de l'extraction.

D'après la norme ISO 10993-12.2, les extraits ont été réalisés selon un rapport d'extraction de 0,1 g de poudre de verre par ml de milieu utilisé [138]. Le milieu d'extraction est constitué du milieu de culture cellulaire usuel DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sans addition de sérum. Celui-ci est rajouté dans le milieu à la fin de la période d'extraction. La période d'extraction est de 120h (norme ASTM F619-86) sous agitation continue (60 rpm) à 37°C afin de simuler au maximum les conditions physiologiques et l'environnement dynamique du corps humain. Après cette période, le liquide d'extraction est filtré (filtre 0,2 µm), afin d'éliminer la présence éventuelle de particules solides du matériau et utilisé pour le traitement des cellules. Différentes dilutions sont étudiées : liquide d'extraction non dilué (100%), dilué à 50% et à 10% dans du milieu de culture. Ces dilutions permettent de déterminer si les extraits sont toxiques en dessous des concentrations suggérées par les normes.

### 1.1.3. Lignées cellulaires

Les cellules utilisées pour le test MTT et Alamar Blue sont des cellules fibroblastiques CCL 1 NCTC clone 929 (souche L de tissu conjonctif de souris). Il s'agit de la lignée L-929 recommandée par les normes standard.

#### *Milieu de culture*

Les fibroblastes L-929 sont cultivées à 37°C en atmosphère humide (à 95/5% : O<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>). Le milieu employé pour la culture des fibroblastes L-929 est le DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), auquel on rajoute 3,7 g/l de bicarbonate de sodium (Sigma), 1% pénicilline (5000 U/ml) / streptomycine (5mg/ml) (Gibco Laboratories) et 10% de sérum FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco Laboratories) inactivé par la chaleur à 56°C pendant 30min.

### 1.1.4. Test MTT

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (3-(4,5dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par l'activité mitochondriale des cellules vivantes actives. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test, mais aussi à leur activité métabolique.

Une solution de MTT (Sigma) est préparée par dissolution de celui-ci dans du tampon phosphate salin PBS (Phosphate Buffer Salin) à raison de 5 mg/ml. Pour son utilisation avec les cellules, la solution MTT est diluée à 0,5 mg/ml. Les fibroblastes L-929 sontensemencés dans des plaques de 96 puits à une densité de  $10^5$  cellules/puit. Elles sont ensuite incubées pendant 24h à 37°C sous atmosphère humide dans leur milieu afin de leur laisser le temps d'adhérer au fond des puits.

Après 1 jour, quand les cellules ont atteint une confluence de 80%, le milieu dans lequel elles ont été incubées est remplacé par les différents extraits ou par du milieu frais (pour les puits de contrôle négatif). Les plaques de culture sont ensuite placées à 37°C et incubées à nouveau pendant 24 h, 48 h et 72 h (différentes durées du traitement avec les extraits). Trois puits sont utilisés pour chaque dilution de chaque matériau. Vingt-quatre puits de contrôle négatif (sans traitement) sont utilisés à titre comparatif. Après chaque temps d'incubation, les extraits sont remplacés par 200  $\mu$ l de solution MTT de concentration 0,5 mg/ml (0,1 mg/puit) et les cellules sont laissées à incuber pendant encore 4h à 37°C. Après la métabolisation du MTT, le surnageant est aspiré et 150  $\mu$ l d'isopropanol acidifié (10% HCl 1N dans l'isopropanol) sont ajoutés dans chaque puit afin de dissoudre les cristaux de formazan. La quantité de cristaux de formazan est quantifiée par spectrophotométrie (Power Wave x 340, Model EL800, BioTek Instruments Inc., VT, USA) en utilisant un filtre à 570 nm avec une référence à 690 nm.

Pour chaque délai, 3 lots de test (3 plaques) ont été réalisés, soit 9 plaques au total. Dans chaque plaque, le test a été effectué dans 3 puits pour chaque composition, granulométrie et dilutions différentes.

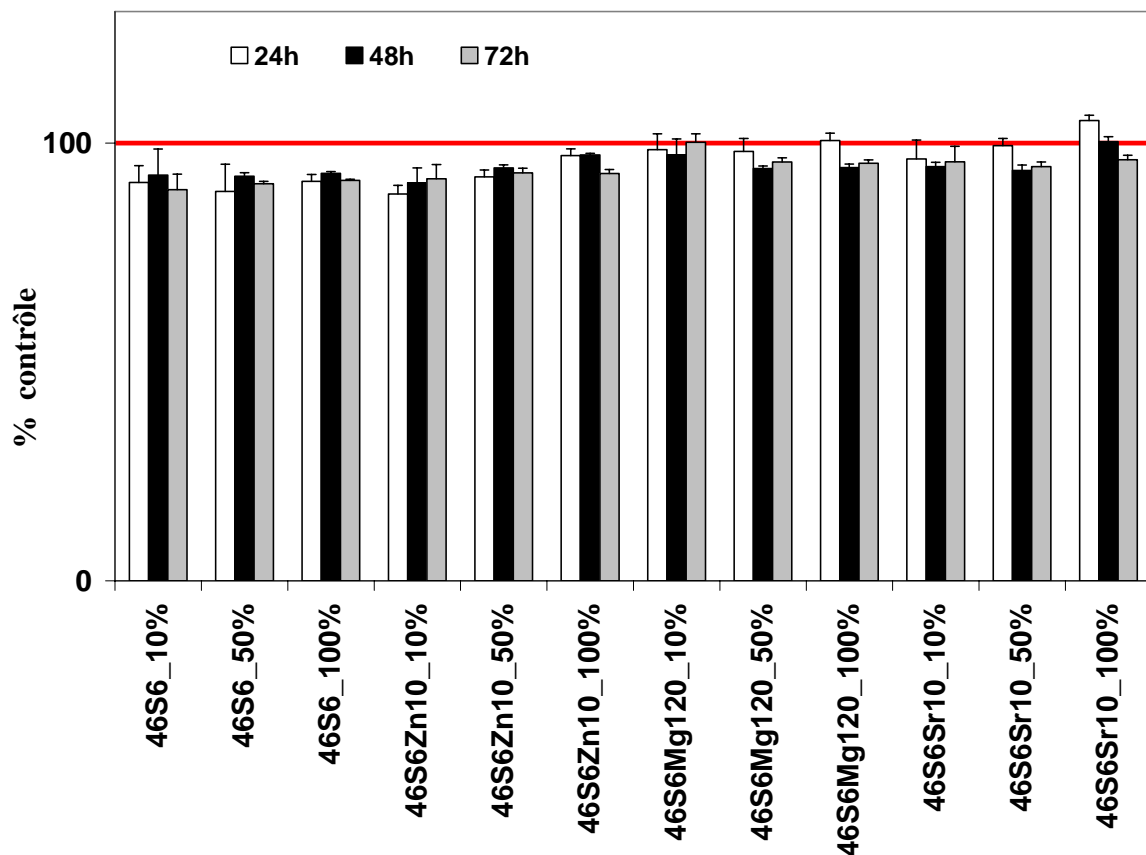
## 1.2. Résultats des tests MTT

Les résultats ont été mesurés en densité optique (DO) pour chaque matériau et comparé avec la densité optique du contrôle. Deux lectures ont été effectuées pour chaque plaque, la valeur analysée étant la moyenne des deux lectures. Les résultats finaux représentent la moyenne des trois lots (pour chaque délai) effectués en triplicata afin de s'assurer de leur reproductibilité. L'effet cytotoxique de chaque échantillon est évalué par le pourcentage de cellules vivantes en présence de cet échantillon, par rapport aux cellules

traitées avec le milieu seul (contrôle négatif). Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire rapportés au contrôle: le *Cell MTT Response* (% contrôle) est calculé avec l'équation :

$$\% \text{ contrôle} = \frac{DO_{\text{traitement}}}{DO_{\text{contrôle}}} \times 100\%$$

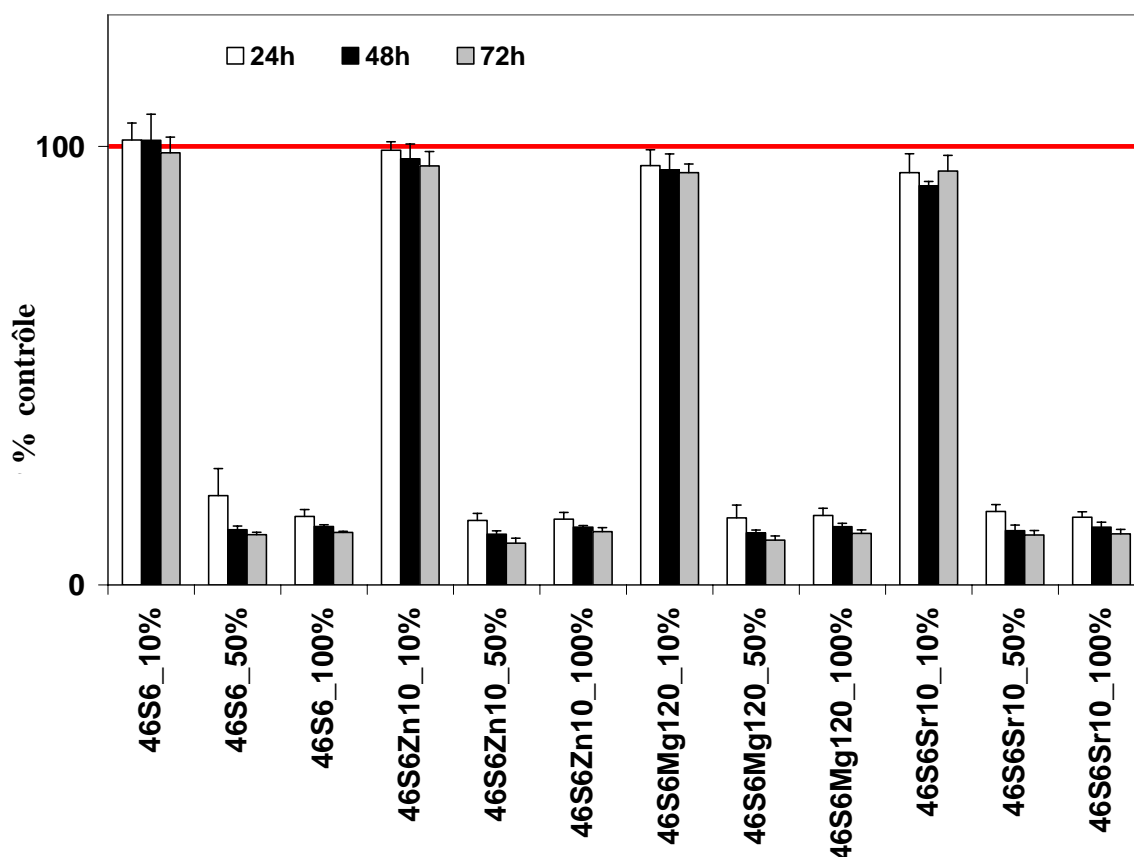
Les résultats sont reportés sur deux figures distinctes. La figure 15.1 donne les résultats du test MTT sur les poudres de verres de granulométrie 500µm. La figure 15.2 représente les résultats du test MTT sur les poudres de verres de granulométrie 50µm. Sur chaque figure, les 4 compositions sont représentées, ainsi que les 3 dilutions pour chaque composition.



**Figure 15.1.** Résultats du test MTT sur les poudres de verres avec une granulométrie de 500 µm

Sur la figure 15.1, les différentes compositions de verres bioactifs ne présentent aucune toxicité quelle que soit la concentration en extrait. La viabilité cellulaire par rapport au contrôle pour les extraits dilués et non dilués est comprise entre 89 et 100% après 72h.

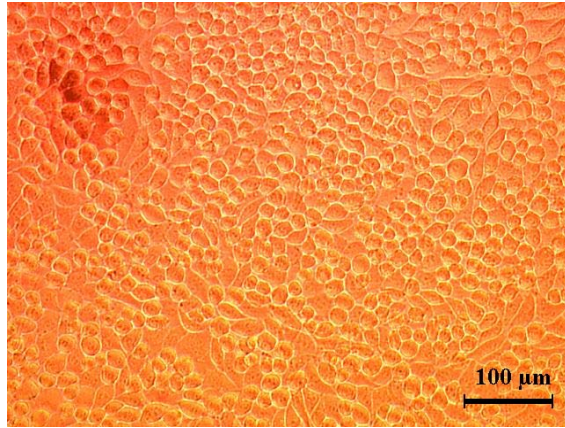
De même, d'après la figure 15.2, pour les 4 compositions, la dilution à 10% ne présente pas de toxicité, avec une viabilité cellulaire comprise entre 91 et 100% par rapport aux contrôles, quelle que soit la durée du traitement. Cependant pour les extraits non dilués et dilués à 50%, la viabilité cellulaire par rapport aux contrôles chute aux environs de 10-15%, quelle que soit la durée du traitement ou la composition du verre bioactif étudié.



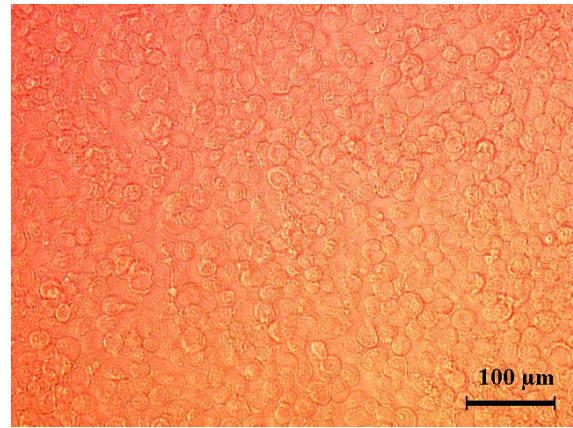
**Figure 15.2.** Résultats du test MTT sur les poudres de verres avec une granulométrie de 50  $\mu\text{m}$

Les résultats obtenus pour une granulométrie de poudre de 500 $\mu\text{m}$  montrent que la toxicité observée ne semble pas provenir du matériau en lui-même. Par contre, la diminution de la granulométrie de la poudre de verre engendre l'augmentation de sa surface spécifique. Ainsi, la poudre de granulométrie 50 $\mu\text{m}$  est plus réactive vis-à-vis de son milieu, ce qui implique des échanges ioniques plus importants entre la poudre de verre et le milieu d'extraction. Des concentrations ioniques trop élevées pour les cellules pourraient donc être responsables de la toxicité observée dans les extraits concernés.

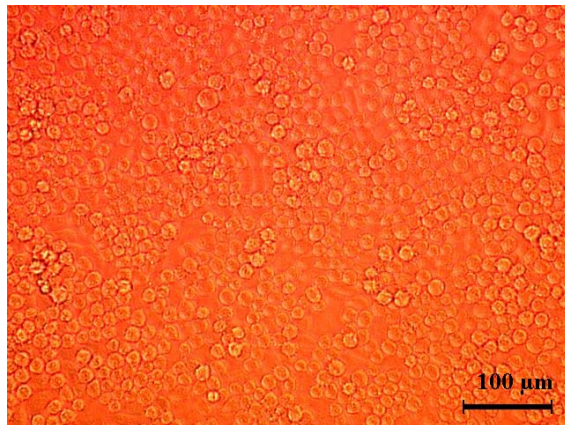
La figure 15.3 présente les photographies au microscope optique des fibroblastes dans les puits après 24h de traitement. Les extraits mis en contact sont ceux obtenus à partir du verre pur 46S6, avec les deux granulométries et pour deux dilutions différentes (10 et 100%).



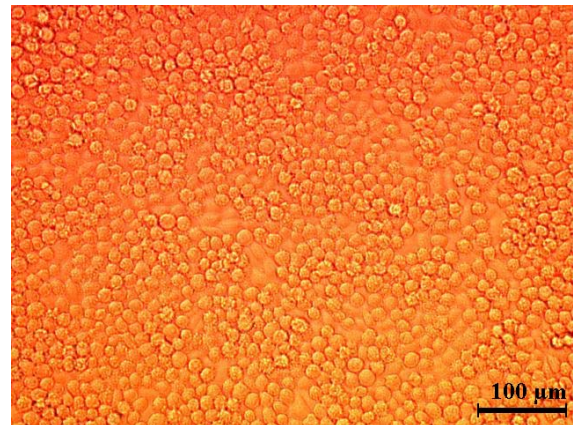
1. 46S6 – 50µm – 10%



2. 46S6 – 50µm – 100%



3. 46S6 – 500µm – 10%



4. 46S6 – 500µm – 100%

**Figure 15.3.** Photographies au microscope optique des fibroblastes dans les puits après 24h de traitement

Sur les photographies 1, 3 et 4, les cellules présentent un aspect normal et une bonne prolifération. Cette observation est confirmée par le test MTT qui ne présente aucune toxicité. A l'inverse, sur la photographie 2, les cellules sont éclatées et par conséquent mortes. Ce constat est également confirmé par le test MTT qui indique une viabilité cellulaire de l'ordre de 10 à 15%. Les résultats obtenus sont néanmoins cohérents avec le fait que la poudre de Bioglass® 45S5 commercialisée présente une granulométrie comprise entre 90 et 710µm.



## 2. Evaluation de la prolifération cellulaire à la surface des verres

Les tests par contact direct permettent de reproduire *in vitro*, sur une monocouche cellulaire, le contact existant *in vivo* entre le matériau et la cellule [138]. Au terme de ce contact, les tests de prolifération cellulaire sont réalisés et permettent d'évaluer l'effet du matériau sur la capacité de la cellule à se diviser.

La technique Alamar Blue, basée sur la coloration de cet indicateur en présence d'un métabolisme cellulaire (potentiel d'oxydoréduction), est rapide, simple, relativement sensible et génère peu de variabilité dans les résultats.

### 2.1. Protocole expérimental

#### 2.1.1. Préparation des échantillons

De la même manière que pour la cytotoxicité, la prolifération cellulaire à la surface des verres bioactifs a été évaluée pour quatre compositions ; il s'agit du 46S6, du 46S6Mg120, du 46S6Zn10 et du 46S6Sr10. Pour cette étude, les verres bioactifs de différentes compositions ont été préparés sous forme d'échantillons massifs. Ils se présentaient sous la forme de disques de 13mm de diamètre et 2mm d'épaisseur. Ils ont été polis à l'aide de différents papiers SiC (de 300 à 1200 grains/cm<sup>2</sup>). La méthode de stérilisation et les lignées cellulaires sont les mêmes que celles utilisées lors de l'évaluation de la cytotoxicité des verres.

#### 2.1.2. Test Alamar Blue

Après dégraissage (10min aux ultrasons dans l'acétone, puis dans l'éthanol) et séchage (15min à 60°C), les échantillons massifs ont été placés directement dans les plaques de 24 puits (15mm de diamètre) et stérilisés. Deux tests préliminaires Alamar Blue (AB1 et AB2) ont été réalisés en faisant varier les trois paramètres suivants : nombre de cellules par puits, quantité de milieu par puits et délais du test. Ils ont permis d'optimiser ces paramètres et un troisième test (AB3) a été ensuite réalisé dans les meilleures conditions.

### **Principe du test AB1**

Les cellules sontensemencées sur chaque échantillon à une densité initiale de 20.000 cellules/puit en présence de 1 ml de milieu complet. Elles sont ensuite incubées à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 1, 2, 5 et 7 jours. Une seule plaque de 24 puits est utilisée pour tous les délais. Cette plaque contient 2 échantillons pour chaque composition de verres bioactifs (soit 8 échantillons au total). 8 autres puits de la plaque sont utilisés comme témoin négatif : les cellules sontensemencées (20.000 cellules/puit) dans les puits avec uniquement 1 ml de milieu complet.

Après 24h d'incubation, le milieu des puits est aspiré et 100µl d'Alamar Blue sont additionnés dans chaque puit analysé. Les plaques sont alors replacées à 37°C dans l'incubateur pendant 4h. A l'issue de ce délai, le surnageant est transféré dans une plaque de 96 puits (on prélève 3 fois 100µl de la solution AB que l'on place dans 3 puits de la plaque de 96 puits, afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures). Deux lectures de la plaque sont effectuées par spectrophotométrie à 570 et 600nm (Power Wave x 340, Model EL800, BioTek Instruments Inc., VT, USA).

Une fois les mesures terminées, la solution restante d'AB dans chaque puit (plaque de 24) est aspirée et les puits sont rincés au PBS (Phosphate Buffer Salin). Afin de poursuivre le test sur la même plaque, on remet 1ml de milieu complet dans chaque puit contenant des cellules, puis la plaque est replacée dans l'incubateur jusqu'au prochain délai. Le même protocole est répété pour les délais d'incubation de 2, 5 et 7 jours.

### **Principe du test AB2**

Une seule plaque de 24 puits est utilisée pour tous les délais. Cette plaque contient 3 échantillons pour chaque composition de verres bioactifs (soit 12 échantillons au total).

Pour chaque composition, les puits sont utilisés de la manière suivante :

- puit 1: 20.000 cellules/puit dans 1,5ml de milieu complet,
- puit 2: 40.000 cellules/puit dans 1,5ml de milieu complet,
- puit 3: 40.000 cellules/puit dans 2ml de milieu complet.

Les 12 autres puits de la plaque sont utilisés comme témoin négatif et sont utilisés de manière identique (4 puits témoins par conditions). La suite du protocole est identique aux conditions décrites dans le test AB 1 et les délais d'incubation à 37°C sont de 4 et 6 jours.

### Principe du test AB3

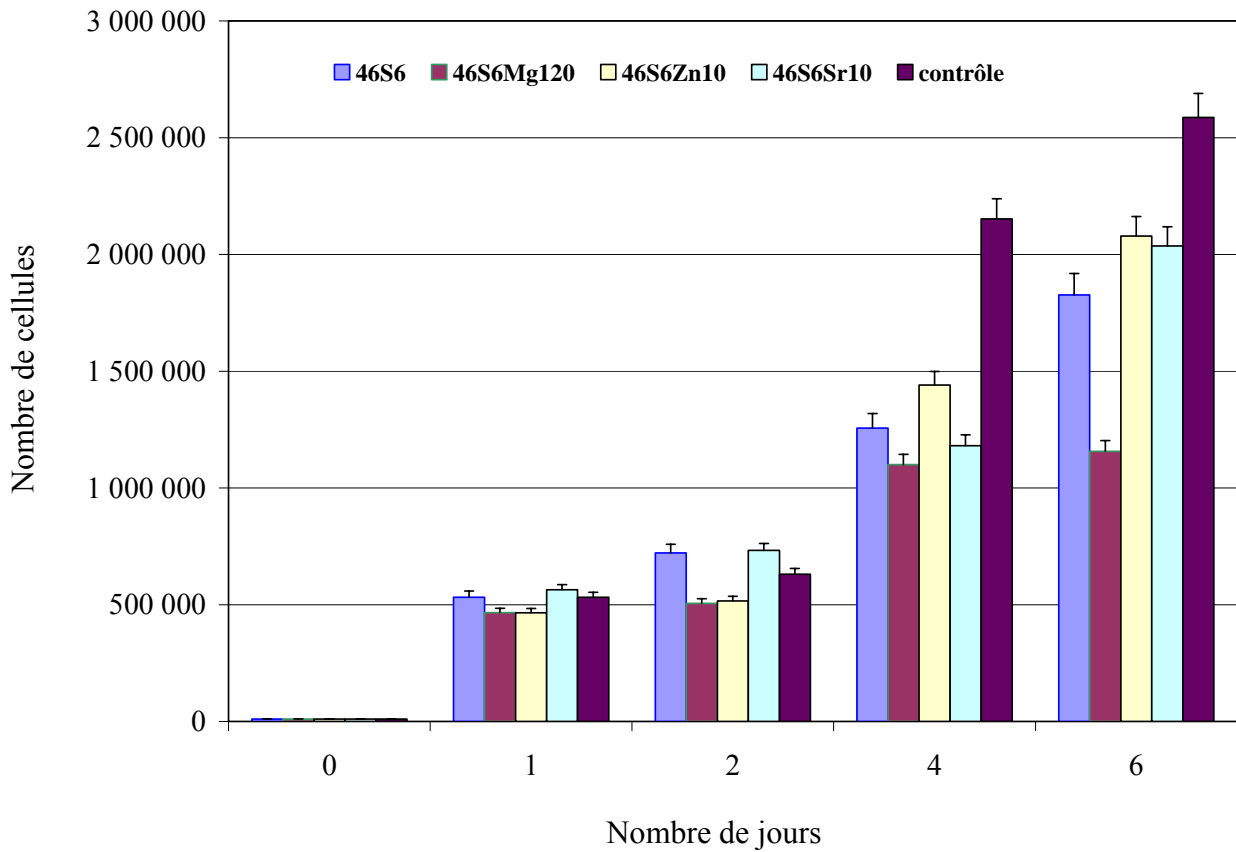
D'après les résultats obtenus lors des deux tests précédents, le test AB3 a été réalisé dans les conditions suivantes : les cellules sontensemencées sur chaque échantillon à une densité initiale de 10.000 cellules/puit en présence de 1,5 ml de milieu complet. Elles sont ensuite incubées à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 1, 2, 4 et 6 jours.

Une seule plaque de 24 puits est utilisée pour tous les délais. Cette plaque contient 3 échantillons pour chaque composition de verres bioactifs (soit 12 échantillons au total). Les 12 autres puits de la plaque sont utilisés comme témoin négatif : les cellules sontensemencées (10.000 cellules/puit) dans les puits avec uniquement 1,5 ml de milieu complet. La suite du protocole est identique aux conditions décrites dans le test AB 1, à l'exception de la quantité d'AB additionnée dans les puits qui est de 165µl, au lieu de 100µl.

## 2.2. Résultats du test Alamar Blue 3

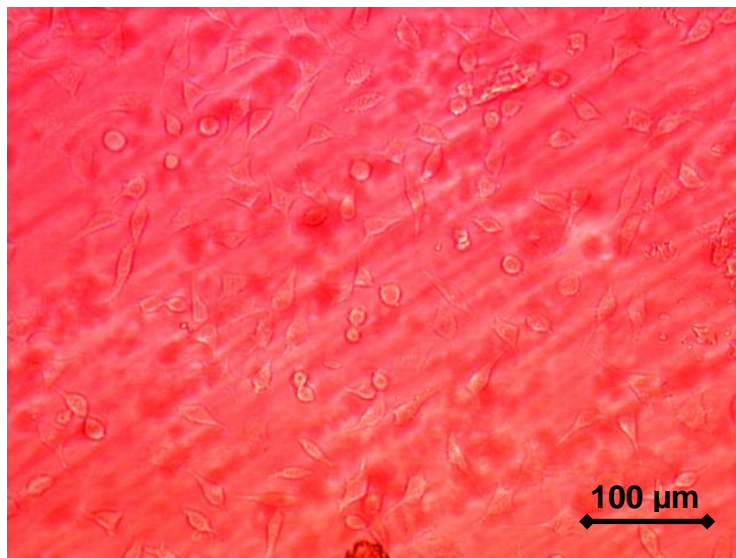
Les résultats ont été obtenus après avoir réalisé des mesures en densité optique (DO) pour chaque matériau et comparés avec une droite d'étalonnage. Cette droite-étalon représente les DO mesurées pour différentes densités cellulaires (de 10.000 à 1.500.000 cellules/puit) et permet de déterminer le nombre de cellules à la surface de nos échantillons pour les différents délais d'incubation. Les résultats des tests AB1 et AB2 ne sont pas donnés ici, car ces tests ont uniquement permis d'optimiser les paramètres du test AB3 pour l'étude de la prolifération cellulaire à la surface de nos matériaux.

Les résultats obtenus pour le test AB3 montrent globalement une très bonne prolifération cellulaire à la surface de nos verres bioactifs. Après 1, 2 et 4 jours d'incubation en présence de nos matériaux, l'influence des éléments dopants sur la prolifération des cellules est faible, à l'exception du zinc qui semble favoriser la multiplication des cellules. Cette tendance est confirmée après 6 jours d'incubation : les verres dopés au zinc et au strontium favorisent la prolifération cellulaire par rapport au verre pur. Le verre dopé au magnésium présente quant à lui des résultats nettement inférieurs : il n'y a quasiment plus de prolifération des fibroblastes entre 4 et 6 jours. Le zinc et le strontium sont donc les éléments favorisant la prolifération des fibroblastes à la surface de nos matériaux, lorsqu'ils sont introduits à l'état de trace (0,1% en masse).



**Figure 15.4.** Prolifération cellulaire à la surface des verres bioactifs à l'issue du test AB3

Sur la figure 15.5, on distingue nettement les fibroblastes à la surface du verre bioactif 46S6, après 5 jours d'incubation. Les cellules sont bien étalées, ce qui signifie qu'elles ont bien adhérentes à la surface du 46S6.



**Figure 15.5.** Fibroblastes à la surface du 46S6 après 5 jours (microscope optique, G×20)

## **B. Etude réalisée sur poudres**

### **3. Evaluation de la cytotoxicité et de la prolifération cellulaire**

#### **3.1. Protocole expérimental**

Lors de cette seconde étude, la cytotoxicité et la prolifération cellulaire ont été évaluées pour six compositions de verres bioactifs; il s'agit des 46S6, 46S6Mg120, 46S6Zn10, 46S6Sr10, 46S6 Os et 46S6 Sup. Les matériaux ont été mis sous forme de poudre avec une granulométrie comprise entre 100 et 600  $\mu\text{m}$ , après broyage et tamisage du verre brut de fusion.

##### **3.1.1. Lignées cellulaires**

Deux lignées ont été retenues pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro* : les SaOS<sub>2</sub> qui sont des cellules osseuses issues d'un ostéosarcome humain et les Eahy926 qui correspondent à une lignée de cellules endothéliales. Les ostéoblastes et les cellules vasculaires sont les deux entités cellulaires au contact des substituts osseux, ce qui justifie le choix de ces lignées pour cette étude.

##### *Culture cellulaire*

Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide (à 95/5% : O<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>). Le milieu de culture utilisé est le DMEM. Ce dernier a été complété par des antibiotiques (pénicilline à 100 UI/ml et de la streptomycine: 100  $\mu\text{g/ml}$ ), par 10% de sérum FBS et par de la glutamine (2mM). Les antibiotiques permettent d'éviter les contaminations bactériennes, le sérum FBS apporte les nutritifs nécessaires à la prolifération cellulaire (facteurs de croissance, vitamine, hormones...) et enfin la glutamine joue un rôle métabolique et structural indispensable aux cellules en culture. Le milieu est dit "complet" quand il contient ces additifs.

### 3.1.2. Méthode d'extraction

Les poudres de verres bioactifs ont été stérilisées en chaleur sèche pendant 1h à 180°C. Le milieu d'extraction est du DMEM additionné d'antibiotiques. Deux concentrations ont été retenues: 0,2 et 1% (rapport P/V). La période d'extraction a été de 24h dans l'incubateur de cellules (5% CO<sub>2</sub>; 37°C et >90% d'humidité). A l'issue de cette période, le milieu a été filtré (filtre 0,2 µm) pour s'assurer de la stérilité du milieu de culture et éliminer les particules de verres bioactifs (de taille > 0,2 µm). Ce milieu a été ensuite complémenté par de la L-glutamine et du sérum FBS comme précédemment : il porte alors le nom de "milieu conditionné".

### 3.1.3. Test à la SulfoRhodamine B (SRB)

#### Principe

Ce test consiste à mesurer la prolifération en fonction des protéines cellulaires totales. Les mesures sont réalisées par dosage de la SRB (Sulfo-rhodamine B). La SRB est un colorant qui se fixe sur les protéines au niveau des acides aminés basiques. La fixation se fait en milieu légèrement acide. On utilise du TCA à 10% final (Acide TriChloroacétique) afin de précipiter les cellules et éliminer les protéines contenues dans le sérum. La SRB est alors solubilisée par une solution de Tris-base. Cette réaction colorimétrique a été retenue car il est possible d'arrêter celle-ci à différents moments (après la fixation des cellules par exemple). Les cellules peuvent alors se conserver plusieurs mois. Ainsi la coloration des différentes plaques à différents moments peut être réalisée le même jour ce qui permet d'éviter les fluctuations.

#### Ensemencement des cellules

Des tests préliminaires ont permis de déterminer les concentrations cellulaires optimales pour l'ensemencement des cellules (J1:  $6 \cdot 10^4$  cellules/ml; J3:  $2,5 \cdot 10^4$  cellules/ml et J6:  $0,8 \cdot 10^4$  cellules/ml). Il est important d'avoir un nombre maximal de cellules pour que le test soit fiable, mais la culture ne doit pas être confluente au moment du test. En effet, les cellules s'arrêteraient de proliférer, ce qui fausserait le test. Un contrôle visuel sous microscope inverse permet de s'assurer de la non-confluence avant l'évaluation de la cytotoxicité. Les deux lignées cellulaires sont ensemencées 24h avant le contact avec le milieu d'extraction. Cette période est nécessaire à l'adhérence des cellules sans qu'il n'y ait réelle prolifération.

### **Protocole expérimental**

Une solution de TCA à 50 % a été préparée, puis conservée à 4°C. Les cellules ont étéensemencées dans les plaques. Après 24h, le milieu dans lequel elles étaient incubées a été remplacé par les différents extraits ou par du milieu frais (pour les puits témoin). L'incubation avec les extraits de verres bioactifs a été effectuée pendant 24 (J1), 72 (J3) et 144 h (J6). Pour le temps de contact le plus long (6 jours), le milieu de culture conditionné a été renouvelé à J3.

A l'issue des délais d'incubation, les plaques ont été placées sur un lit de glace. La solution de TCA a été ajoutée pour obtenir une concentration finale de 10 % en TCA (50µl TCA 50% + 200µl milieu de culture = 250 µl à 10% TCA). Les cellules ont été fixées pendant une heure sur la glace. Après fixation, les plaques ont été rincées 5 fois abondamment à l'eau du robinet, puis séchées à l'air libre. A partir de ce moment, les plaques peuvent être conservées plusieurs mois.

La solution de SRB a été préparée à 0,4 % dans une solution d'acide acétique à 1 %, puis 100 µl de cette solution ont été ajoutés par puits. On laisse agir 30 minutes sous agitation ; à l'issue de ce délai, les puits ont été rincés 4 fois à l'acide acétique à 1 %. La SRB a été dissoute dans une solution de Tris-base à 10 mM non tamponné (pH 10-11). Deux lectures de la plaque ont été effectuées par spectrophotométrie à 492 nm.

Chacune des expériences a été réalisée 3 à 5 fois de manière indépendante.

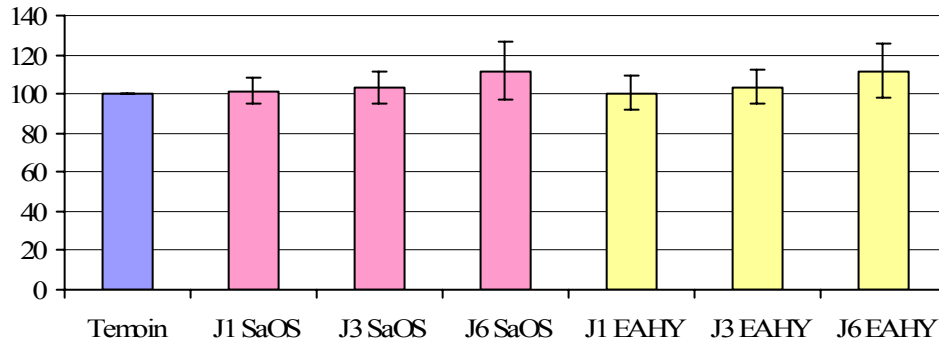
### **3.2. Résultats du test SRB**

Pour chaque temps d'incubation et pour chaque lignée, les résultats ont été mesurés en densité optique et exprimés par rapport au témoin ou contrôle, c'est-à-dire par rapport aux cellules proliférant sans contact avec le milieu d'extraction. Ce témoin est fixé à 100%.

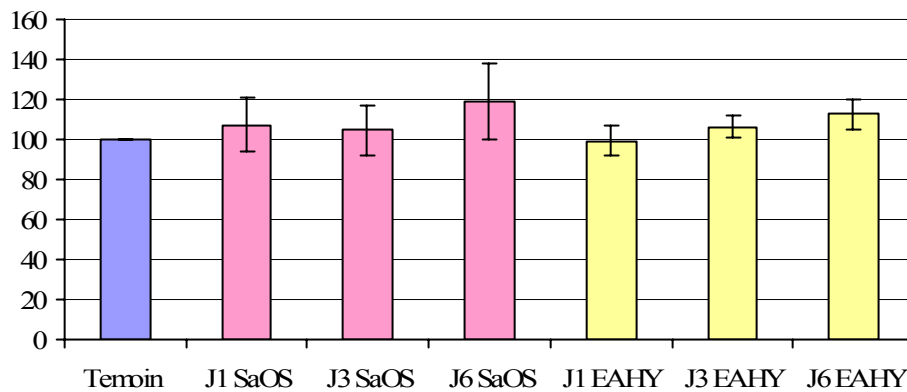
#### **Milieu conditionné 46S6**

- à 0,2 % : par rapport au témoin, la prolifération des SaOS<sub>2</sub> augmente en fonction du temps d'incubation ; cette dernière est de 101 % à J1, 103 % à J3 et à 112 % à J6. Ce phénomène est identique pour la lignée endothéliale.

- Quand la concentration est de 1 %, une croissance plus marquée est observée à J6. En effet, un différentiel de 20 % est atteint avec le témoin pour la lignée d'ostéosarcome et de 12 % pour les EAhy926.



**Figure 15.6.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6 à 0,2 %



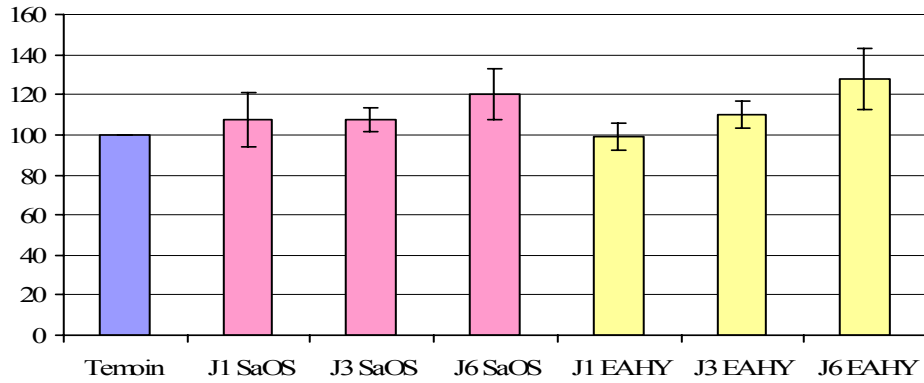
**Figure 15.7.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6 à 1 %

#### Milieu conditionné 46S6Mg120

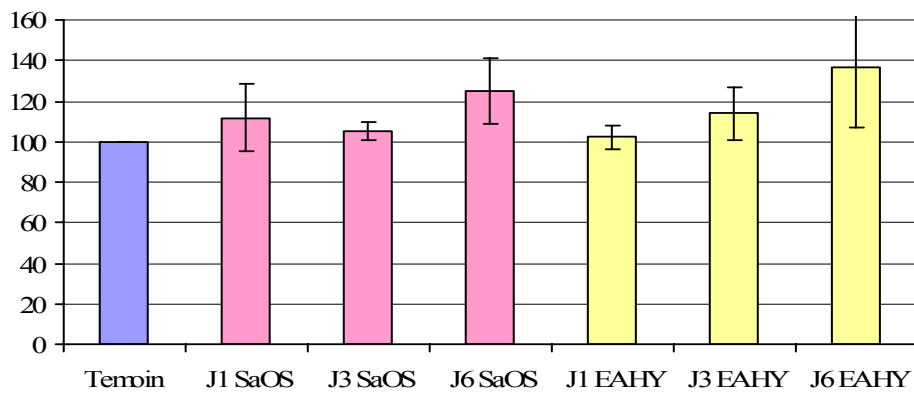
- à 0,2 % : le maximum de prolifération est relevé après 6 jours de contact avec le milieu conditionné, soit +20 % pour les SaOS<sub>2</sub> et +28 % pour les EAhy926.

- à 1 % : après 6 jours, le nombre de cellules augmente d'environ +25 % et +36 % respectivement pour les ostéoblastes et cellules endothéliales.





**Figure 15.8.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6Mg120 à 0,2 %

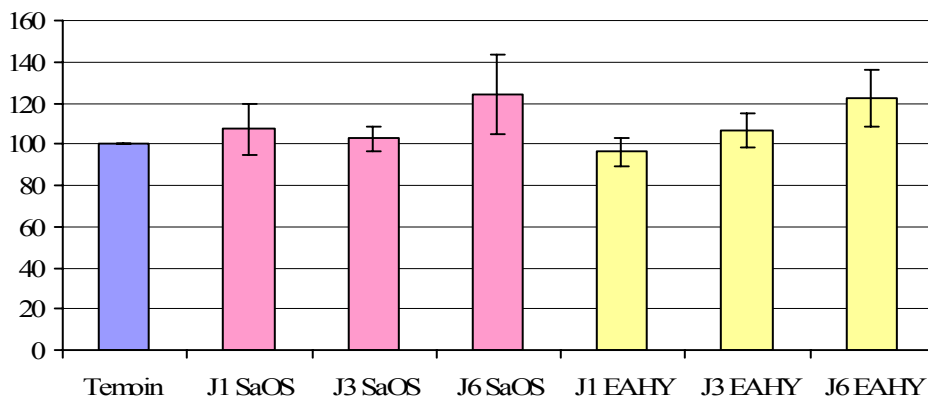


**Figure 15.9.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6Mg120 à 1 %

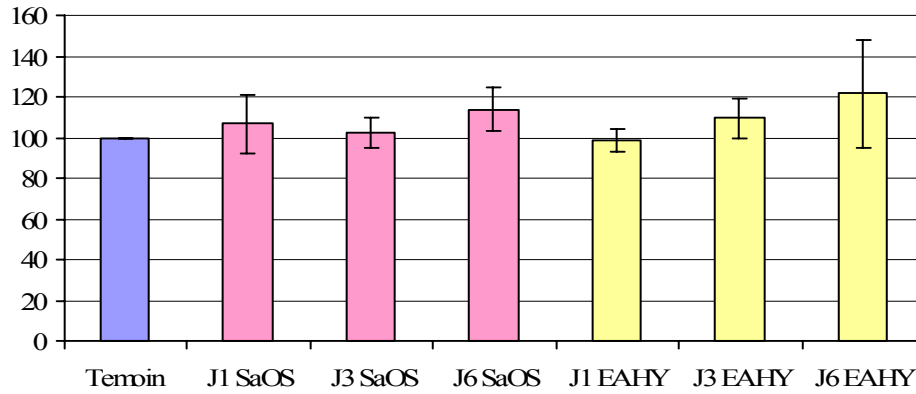
#### Milieu conditionné 46S6Zn10

- à 0,2 % : là encore, le maximum de prolifération est relevé après 6 jours de contact avec le milieu conditionné, soit +25 % pour les SaOS<sub>2</sub> et +23 % pour les EAh926.

- à 1 % : à J6, la croissance cellulaire est de +13 % pour les SaOS<sub>2</sub> et +21 % pour les EAh926.



**Figure 15.10.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6Zn10 à 0,2 %

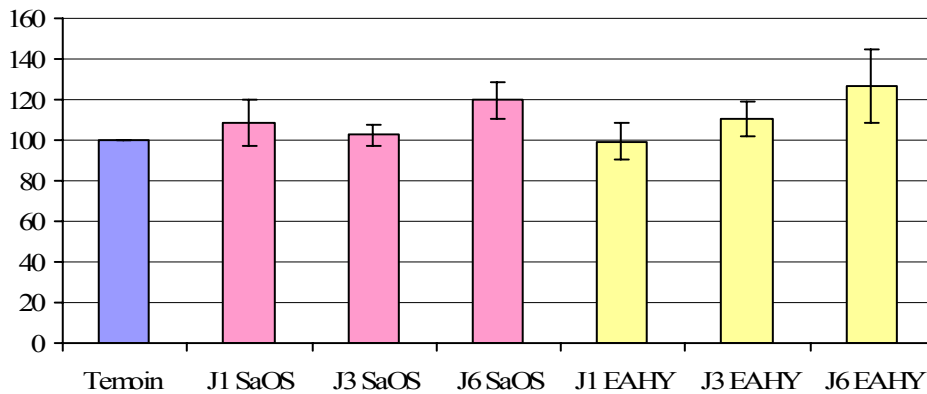


**Figure 15.11.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6Zn10 à 1 %

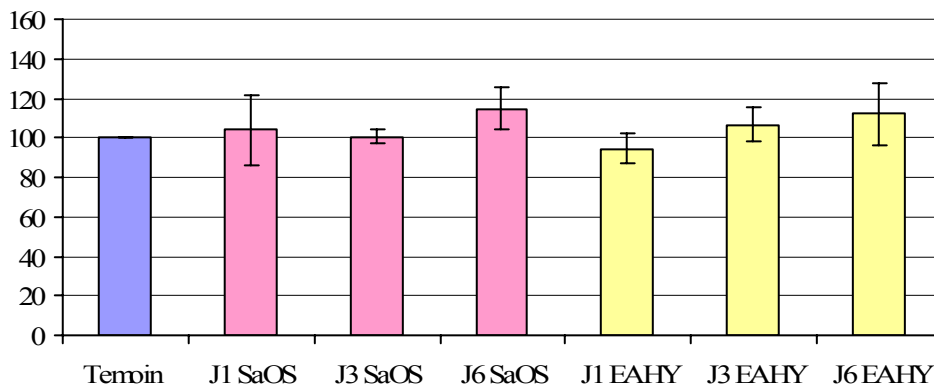
#### Milieu conditionné 46S6Sr10

- à 0,2 % : à J6, la prolifération cellulaire est de +20 % pour les SaOS<sub>2</sub> et +27 % pour les EAhy926.

- à 1 % : La croissance par rapport au témoin est de plus + 14 % pour la lignée ostéoblastique et de +12 % pour la lignée vasculaire.



**Figure 15.12.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6Sr10 à 0,2 %

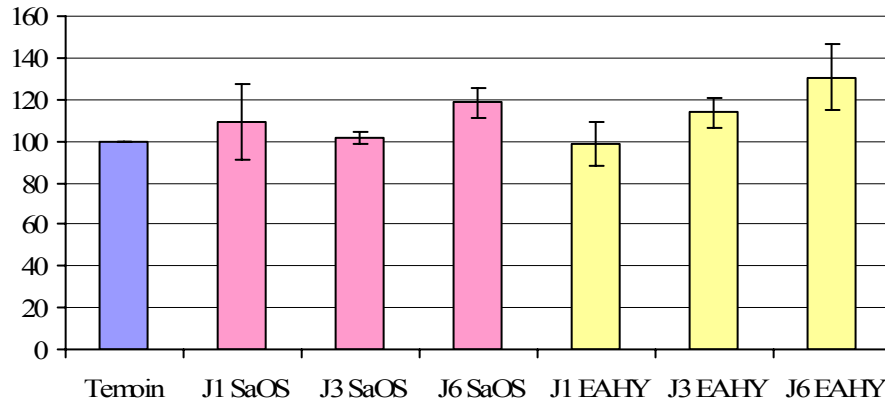


**Figure 15.13.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6Sr10 à 1 %

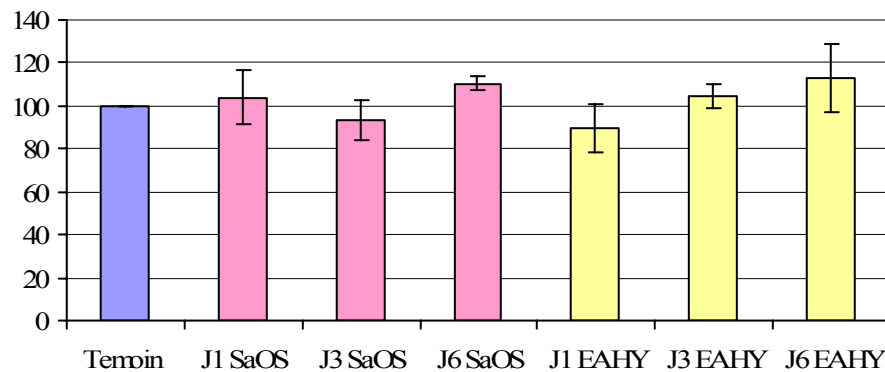
### Milieu conditionné 46S6 Os

- à 0,2 % : le maximum de prolifération est relevé après 6 jours de contact avec le milieu conditionné, soit +18 % pour les SaOS<sub>2</sub> et +30 % pour les EAhy926.

- à 1 % : à J6, la croissance cellulaire est de +11 % pour la lignée ostéoblastique et +13 % pour la lignée vasculaire.



**Figure 15.14.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6 Os à 0,2 %

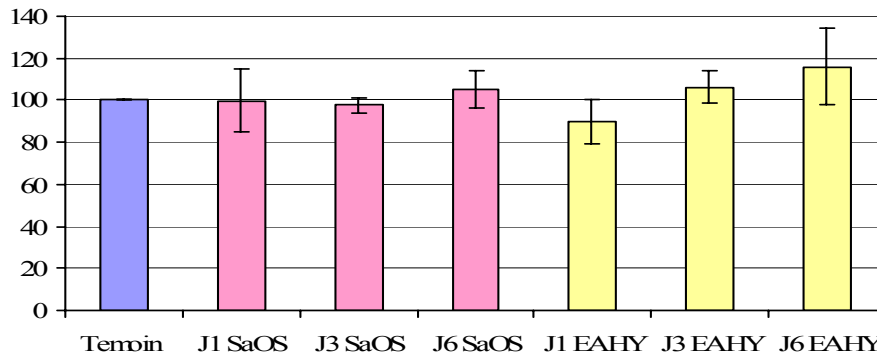


**Figure 15.15.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6 Os à 1 %

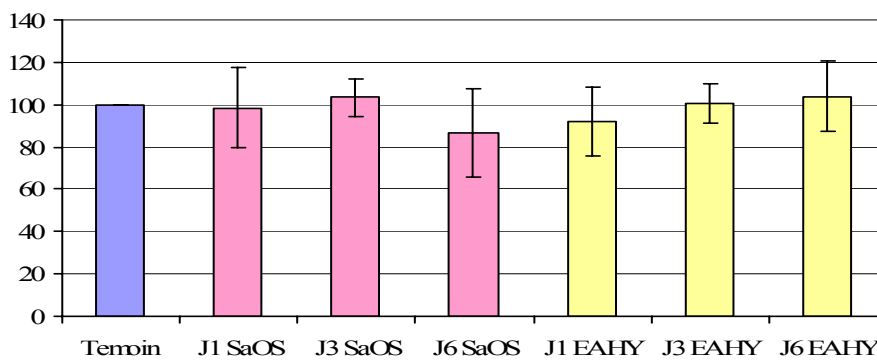
### Milieu conditionné 46S6 Sup

- à 0,2 % : le maximum de prolifération est relevé après 6 jours de contact avec le milieu conditionné, soit +5 % pour les SaOS<sub>2</sub> et +16 % pour les EAhy926.

- à 1 % : au 6<sup>ème</sup> jour de contact, la viabilité cellulaire est de 87 % pour la lignée ostéoblastique et de 104 % pour la lignée vasculaire



**Figure 15.16.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6 Sup à 0,2 %



**Figure 15.17.** Résultats du test SRB pour les extraits de 46S6 Sup à 1 %

### 3.3. Discussion des résultats

Quelque soit la composition de verre bioactif utilisée, la prolifération cellulaire augmente au cours du temps d'incubation, exceptée pour l'extrait de 46S6 Sup à 1% où une certaine toxicité apparaît à J6. Cette augmentation est maximale après 6 jours de contact. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, qui démontrent la nécessité de plusieurs jours d'incubation pour que les produits de dissolution des verres bioactifs interfèrent sur l'expression des gènes régulant le cycle cellulaire [3]. Cependant, après 3 jours d'incubation, dans la quasi-totalité des expérimentations, une baisse du nombre des cellules est enregistrée, ce qui a conduit à renouveler le milieu conditionné à 72h. A notre connaissance, aucune explication biologique n'a été trouvée pour expliquer ce phénomène. Il pourrait s'agir d'une dégradation ou d'une interaction des produits de dissolution au cours du temps.

Dans ce travail, les meilleurs résultats en termes de prolifération cellulaire, qui demanderont à être confirmés par des études complémentaires, sont obtenus avec le milieu conditionné par le verre 46S6Mg120. Celui-ci conduit à une augmentation de la prolifération des SaOS<sub>2</sub> de 20 (0,2 %) à 25 % (1 %) et de 28 (0,2 %) à 36 % (1 %) pour les EAhy926. Pour les autres verres bioactifs et après 6 jours de contact, des viabilités cellulaires de l'ordre de 120 % sont obtenues, avec une perte de 5 à 10 % du nombre de cellules à la concentration la plus forte (1%). Une prolifération moins importante a été enregistrée avec l'extrait de 46S6 Sup où une augmentation du nombre de cellules de 5 à 15 % est obtenue pour la concentration à 0,2 % et de -14 % à +3 % pour la concentration à 1 %.

Cette étude montre donc l'effet des produits de dissolution en fonction du temps de contact. A l'inverse, aucun effet dose-dépendant n'a été mis en évidence. En effet, dans la majorité des cas, les résultats sont comparables entre les concentrations (P/V) à 0,2 % et 1 %, voire inférieurs quand la quantité de verres bioactifs augmente. L'effet des milieux conditionnés n'est pas cellule-dépendant puisque l'effet biologique est tout à fait comparable, pour une même durée d'incubation et une même concentration, entre les lignées humaines de cellules osseuses et de cellules endothéliales.

Les mécanismes par lesquels les produits de dissolution des verres bioactifs agissent aux niveaux cellulaire et moléculaire demeurent, actuellement, largement inconnus. Un effet indéniable du calcium comme cofacteur enzymatique et électrolyte a été démontré mais n'explique pas tous les phénomènes observés [140]. Un rôle du silicium a également été rapporté par plusieurs auteurs sans que la cible cellulaire n'ait été identifiée [140-141].

## PARTIE 6

# **Autres formes d'utilisation des verres bioactifs**



## Chapitre 16

### Elaboration de phosphosilicates poreux à base de verre

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, les biomatériaux poreux interagissent avec les tissus par l'intermédiaire d'une fixation biologique. Afin de permettre une vascularisation, ainsi qu'une bonne cohésion et une bonne colonisation de l'implant par l'os, le biomatériau doit présenter une porosité élevée ( $\approx 50\%$ ) et une taille de pore adaptée (supérieure à  $100\text{ }\mu\text{m}$ ) pour faciliter la prolifération cellulaire et le dépôt de matière organique. Il est également nécessaire que les pores soient ouverts et interconnectés.

L'objectif de cette étude est donc d'élaborer un nouveau matériau, capable de répondre aux exigences en termes de porosité et d'être utilisé en tant que biomatériaux de comblement ou de substitution osseux. Son originalité consiste en la création de porosité dans un matériau à base de verre avec une mise en œuvre simple, pratique, reproductible, en un temps relativement court et à faible coût.

#### 1. Le phénomène d'expansion

##### 1.1. Principe de la méthode

La porosité sera créée au sein du matériau en utilisant un phénomène original, déjà étudié pour d'autres applications, appelé phénomène d'expansion. Dans l'état de la technique, il est connu de fabriquer des matériaux poreux à partir de verres de récupération en faisant appel à la technique d'expansion du verre au moyen de carbonate et de nitrure d'aluminium, qui provoque, par élévation de température, un dégagement de dioxyde de carbone et de diazote respectivement (brevet US n° 2 837 873 et brevet n° 85 03694) [142].

Cependant, un tel matériau ne peut pas être utilisé en tant que biomatériau, notamment parce que le verre utilisé contient de nombreux éléments toxiques pour l'organisme et présente une taille de pores trop importante.



Dans la pratique, les matériaux poreux à base de verre, utilisés en tant que biomatériaux, sont synthétisés par voie sol-gel. L'intérêt de la technique d'expansion réside dans le fait que la synthèse des matériaux obtenus par voie sol-gel s'avère être longue (plusieurs jours) et complexe, à faible rendement (peu de matière est synthétisée à chaque fois) et coûteuse, ce qui influence défavorablement les coûts de production d'un tel produit.

Dans notre étude, il s'agit donc d'obtenir un phosphosilicate partiellement cristallisé présentant une structure poreuse, élaboré à partir de verre broyé 46S6 et utilisable en tant que biomatériau. A cette fin, les éléments utilisés pour synthétiser ce matériau sont connus pour ne présenter aucune toxicité.

Le dégagement gazeux responsable de la réaction d'expansion provient de l'oxydation d'un nitrure métallique, mélangé à la poudre de verre broyé, par traitement thermique. Le nitrure peut être oxydé soit par l'oxygène de l'air, soit par les oxydes entrant dans la composition du verre. Lorsque l'oxydation a lieu avec les oxydes composant le verre, la réaction est dite *in situ*. C'est ce dernier cas qui nous intéresse ; le phénomène d'expansion a lieu lorsque l'état du milieu fondu permet le piégeage et le développement du dégagement gazeux formé *in situ*. Grâce à la viscosité du verre, le gaz ne peut pas s'échapper facilement et reste emprisonné. Les bulles d'azote font gonfler l'ensemble de la masse lorsque l'on maintient pendant un certain temps la température constante. On obtient alors un matériau poreux.

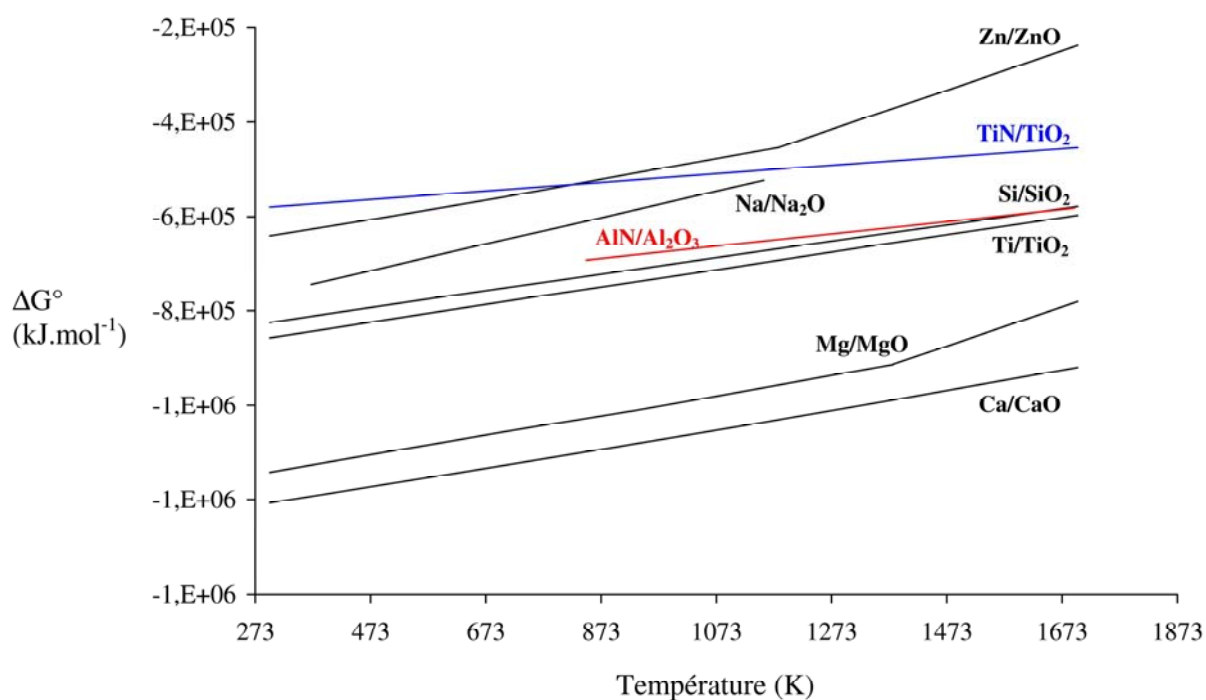
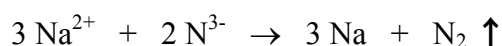
L'étude qualitative des différents facteurs qui interviennent dans les mécanismes de formation de pores et d'expansion du matériau montre que ceux-ci sont nombreux. Les paramètres principaux sont :

- la nature et la teneur en espèces réactives dans le verre,
- la nature et la quantité du nitrure utilisé,
- la granulométrie et l'homogénéité de la poudre mélangée,
- la nature du traitement thermique.

## 1.2. Choix des nitrures utilisés

Afin d'obtenir une répartition régulière et homogène des pores à l'intérieur du matériau, il est nécessaire que le nitrure réagisse avec au moins un oxyde entrant dans la composition du verre et à une température supérieure à la température de transition vitreuse.

Le nitrure utilisé comme agent d'expansion lors des travaux antérieurs est exclusivement le nitrure d'aluminium AlN [142-143]. La figure 16.1 représente l'évolution de l'enthalpie libre  $\Delta G^\circ$  en fonction de la température pour différentes réactions d'oxydation. L'étude du diagramme d'Ellingham montre que le nitrure d'aluminium peut réagir avec certains oxydes et notamment  $\text{Na}_2\text{O}$ , qui entre dans la composition du 46S6. On peut donc supposer que la réaction d'oxydation est la suivante :



**Figure 16.1.** Evolution de l'enthalpie libre  $\Delta G^\circ$  en fonction de la température

La première partie de notre étude a donc portée sur la réaction d'expansion à partir de nitrure d'aluminium et de verre 46S6 broyé, en nous basant sur les travaux effectués antérieurement, afin de tester la faisabilité de ce projet. Cependant, l'aluminium est universellement considéré comme un élément métallique « toxique » [144]. La toxicité de l'aluminium est prouvée, que ce soit pour les plantes, les animaux ou les hommes, mais l'aluminium est également constitutif de certains biomatériaux (prothèses de hanche ou substituts osseux à base d'aluminium) car cet élément présente certains intérêts physico-chimiques comme la résistance à la corrosion ou aux contraintes mécaniques.

Aussi afin de nous affranchir des interrogations concernant la biocompatibilité d'un matériau contenant de l'aluminium et des réticences observées face à cet élément, nous avons choisi d'étudier, dans une seconde partie, la réaction d'expansion à partir d'un autre nitrure. Notre choix s'est porté sur le nitrure de titane TiN ; en effet, le titane est un élément connu pour son inertie chimique et sa biocompatibilité [145-146]. De ce fait, les alliages de titane connaissent un grand succès auprès des prothésistes, mais ils permettent également aux personnes développant des allergies vis-à-vis de certains métaux (argent, nickel,...) de porter des montures de lunettes métalliques ou des bijoux (montres, piercing,...).

L'étude du diagramme d'Ellingham (figure 16.1) nous montre cette fois que le nitrure de titane ne réagit avec aucun oxyde présent dans la composition du verre 46S6. Pour que la réaction d'expansion ait lieu, il nous a donc fallu modifier la composition du verre 46S6 en intégrant un oxyde capable de réagir avec le nitrure d'aluminium. Notre choix s'est porté sur ZnO, d'une part pour sa réactivité avec TiN et d'autre part pour les propriétés physiologiques intéressantes du zinc (développées dans le Chapitre 1). Le verre utilisé dans cette seconde partie appartient donc au système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-ZnO-P}_2\text{O}_5$ .

## 2. Protocole expérimental

Les phosphosilicate poreux étudiés sont synthétisés en effectuant les étapes suivantes :

### Synthèse du verre

On procède tout d'abord à la synthèse des verres par la méthode de fusion à haute température. Le protocole de synthèse détaillé est le même que celui présenté dans le Chapitre 4 : fusion des poudres à haute température, puis recuit à une température voisine de la température de transition vitreuse des verres.

Deux compositions différentes de verre ont été utilisées selon le nitrure employé lors de la réaction d'expansion ; ces compositions sont présentées dans le tableau 16.1.

Compositions (% massiques)	<b>46S6</b> (expansion avec AlN)	<b>46S6Zn</b> (expansion avec TiN)
SiO <sub>2</sub>	46	46
CaO	24	19
Na <sub>2</sub> O	24	19
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6	6
ZnO		10

**Tableau 16.1.** Compositions en oxyde des verres utilisés pour les réactions d'expansion

### Broyage du verre

Le verre synthétisé est ensuite broyé jusqu'à obtention d'une poudre fine (granulométrie inférieure à 40  $\mu\text{m}$ ) et homogène. Le broyage est réalisé à l'aide d'un broyeur planétaire (Retsch, PM 100). Le temps de broyage est fixé à 10 min pour 100g de verre, à une vitesse de rotation de 600 rpm.

### Ajout du nitrure

On additionne au verre broyé 2% en masse de nitrure, puis on homogénéise le mélange ainsi obtenu pendant 45 min au mélangeur planétaire.

### Synthèse du phosphosilicate poreux

Le mélange de poudre est placé dans un moule en acier réfractaire, préalablement enduit d'un agent démoulant (mélange eau, carbonate de calcium et silicate de sodium). Le traitement thermique s'effectue dans un four à moufle ; le programme utilisé comprend une rampe contrôlée de montée en température, un palier à température constante et une descente libre en température, suivant l'inertie thermique du four.

## 3. Essais d'expansion

### 3.1. Expansion à partir du nitrure d'aluminium AlN

Des essais d'expansion ont été réalisés pour le mélange verre 46S6 – 2% AlN. Le tableau 16.2 représente les températures de réaction et les durées de palier pour tous les échantillons réalisés. Toutes les rampes de montée en température ont été effectuées à 12°C/min.

Température de réaction (°C)	Durées du palier (min)				
900					90
950					90
1000					90
1050	5				90
1100	5	15	30	60	90
1110	5	15	30	60	90
1120	5				
1130	5				
1140	5				
1150	5	15	30	60	90
1160	5				
1170	5				
1180	5				
1190	5				

**Tableau 16.2.** Paramètres des essais d'expansion à partir de nitrure d'aluminium

L'expansion se fait de façon satisfaisante lorsque la température de réaction est supérieure ou égale à 1100 °C. Pour les quatre premiers échantillons réalisés (la température de réaction est inférieure à 1100 °C) ainsi que pour l'échantillon synthétisé à 1190 °C, l'expansion de la matrice vitreuse et donc la formation de pores n'a pas été observée. Pour les températures inférieures à 1100°C, nous supposons que la réaction d'expansion n'a pas encore lieu ; à 1190°C, le gaz semble s'être échappé de la matrice vitreuse à cause d'une viscosité trop faible.

### 3.2. Expansion à partir du nitrure de titane TiN

De la même manière, les essais d'expansion ont été réalisés pour le mélange verre 46S6Zn -TiN. Le tableau 16.3 représente les températures de réaction, les durées de palier ainsi qu'une appréciation visuelle de la qualité de l'expansion pour tous les échantillons réalisés. Les rampes de montée en température ont été effectuées à 10°C/min.

Température de réaction (°C)	Rampe de montée en température (°C/min)	Durées du palier (min)		
900	10	10		
950	10	10		
1000	10	10	30	60
1020	10	10		
1050	10	10		
1100	10	10		

**Tableau 16.3.** Paramètres des essais d'expansion à partir de nitrure de titane



## Chapitre 17

### Matériaux poreux obtenus avec le nitrure d'aluminium

Ce chapitre a pour but de présenter les phosphosilicates synthétisés à partir de la réaction entre le verre 46S6 et le nitrure d'aluminium. De nombreux essais d'expansion ont été réalisés ; nous avons ensuite choisi les matériaux présentant les caractéristiques morphologiques les plus intéressantes pour effectuer les différentes caractérisations physico-chimiques et réaliser les tests *in vitro*.

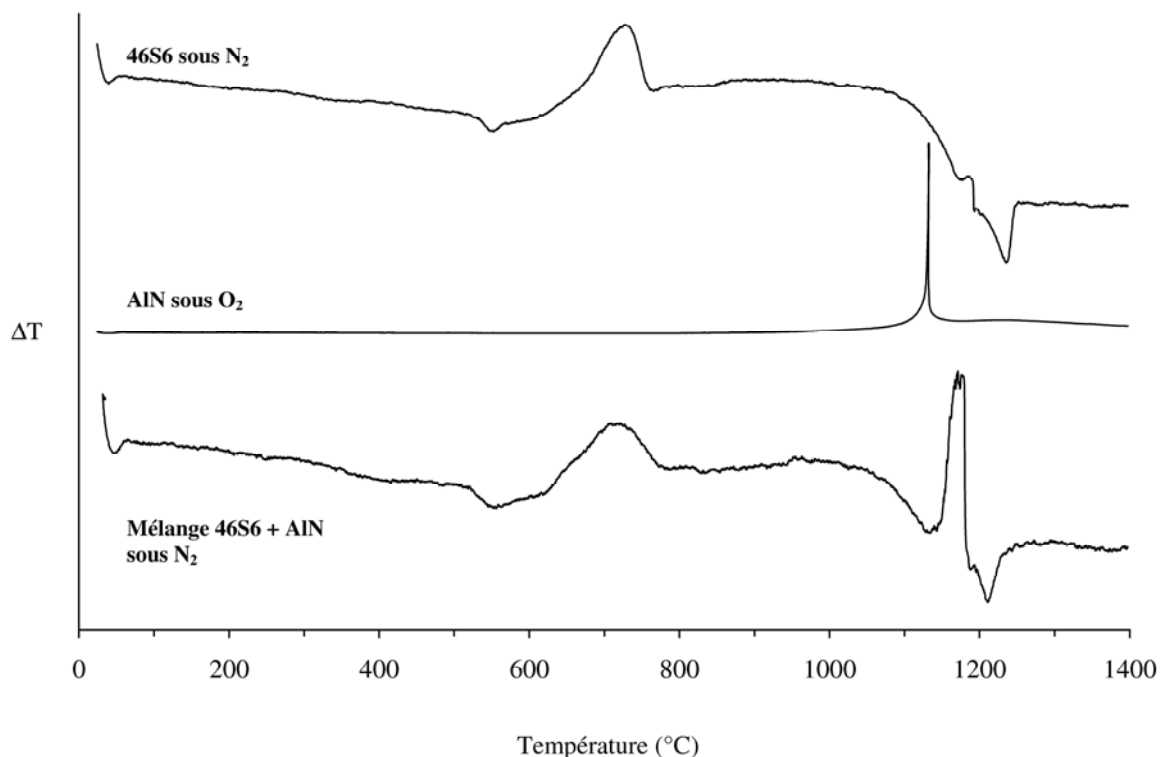
#### 1. Optimisation des paramètres de synthèse

##### 1.1. Températures caractéristiques

La figure 17.1 représente les courbes d'analyse thermique différentielle obtenues pour les produits de départ : le verre 46S6 sous  $N_2$ , le nitrure d'aluminium sous  $O_2$  (pour déterminer la température d'oxydation d'AlN) et le mélange verre 46S6 + 2% AlN sous  $N_2$ .

On retrouve les caractéristiques thermiques du verre 46S6 présentées dans le Chapitre 4 :  $T_g$  à  $539^\circ C$ ,  $T_c$  à  $731^\circ C$  et  $T_f$  à  $1225^\circ C$ . L'oxydation du nitrure d'aluminium sous  $O_2$  débute à partir de  $900^\circ C$  et accélère aux environs de  $1100^\circ C$ . L'analyse thermique du mélange 46S6 + 2% AlN sous  $N_2$  présente une allure de courbe originale. En effet, un pic endothermique est observé à  $T_g = 540^\circ C$  et correspond à la température de transition vitreuse du verre 46S6. La transition vitreuse est suivie d'un pic exothermique à  $T_c \approx 730^\circ C$ , caractéristique de la cristallisation du verre 46S6. Un second pic exothermique débute à environ  $1150^\circ C$  ; il ne correspond à aucune transformation du verre sous  $N_2$  ou du nitrure d'aluminium sous  $O_2$ . La gamme de températures de cette réaction comprend les températures pour lesquelles les essais de synthèse présentent une bonne expansion. Ce pic caractérise alors la réaction chimique exothermique entre le nitrure d'aluminium et  $Na_2O$ , qui provoque le dégagement gazeux.





**Figure 17.1.** Analyse thermique différentielle des produits de départ

Enfin un pic endothermique, caractéristique de la fusion du verre, est observé à  $T_f \approx 1220^\circ\text{C}$ . Ce pic présente une légère séparation que l'on peut attribuer à la présence de deux phases cristallines différentes.

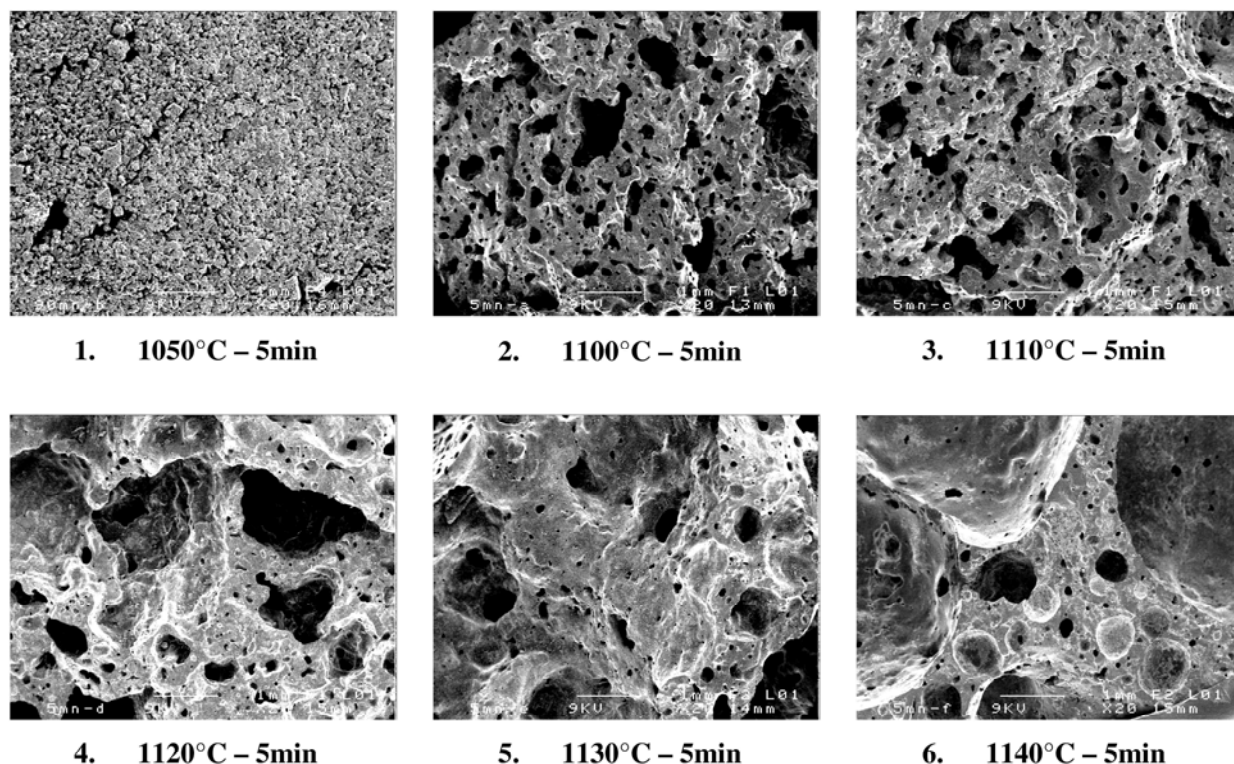
## 1.2. Etude de la morphologie des matériaux synthétisés

### 1.2.1. Influence de la température de réaction

L'objectif de cette étude est d'observer, par microscopie électronique à balayage, l'évolution de la morphologie des matériaux synthétisés avec le nitrure d'aluminium et en particulier l'évolution de la porosité, en fonction de la température de réaction. Dans cette étude, la température du palier est fixée à 5 min.

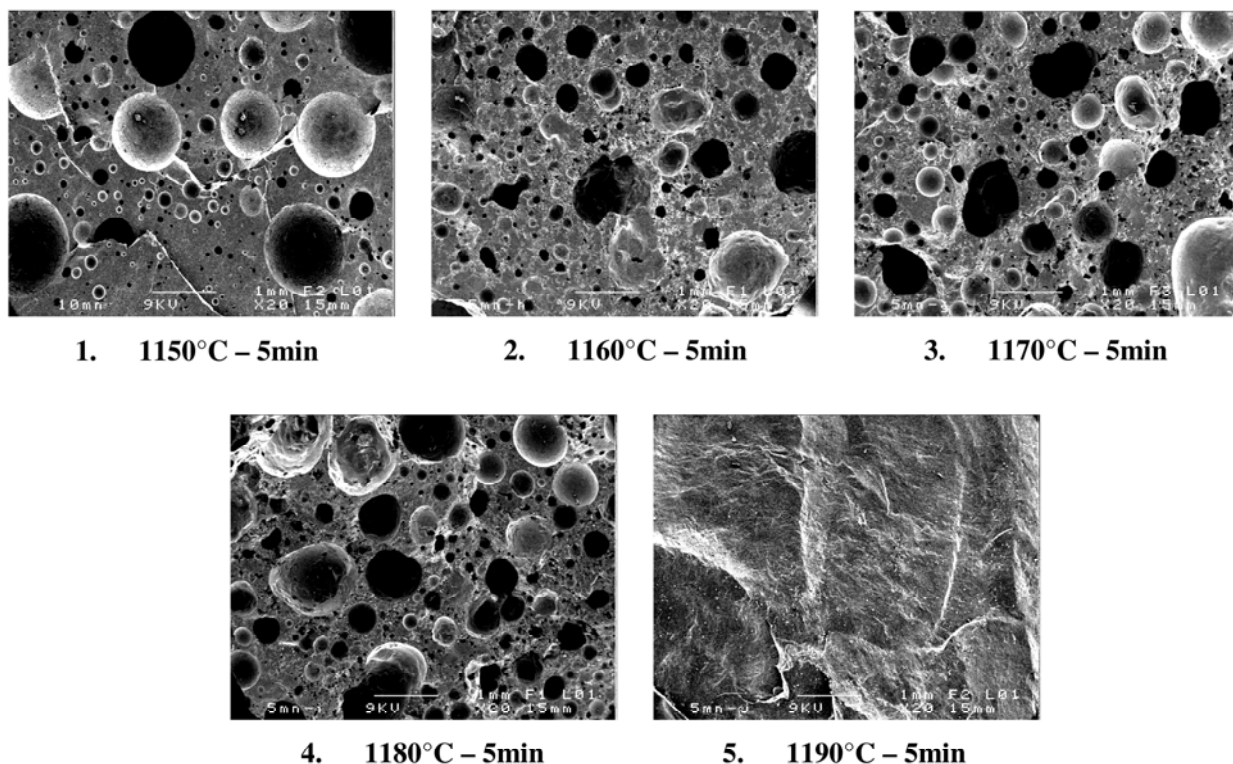
Les figures 17.2 et 17.3 présentent les micrographies ( $\times 20$ ) de la surface des phosphosilicates obtenus par réaction d'expansion. Toutes les synthèses ont été effectuées en

suivant le même protocole (Chapitre 16). La durée du palier de la réaction est fixée à 5 min et seule la température du palier varie. Cette dernière est comprise entre 1050 et 1140°C pour la figure 17.2 et entre 1150 et 1190°C pour la figure 17.3.



**Figure 17.2.** Morphologie des phosphosilicates synthétisés pour des températures de réaction comprises entre 1050 et 1140°C ( $\times 20$ )

Le phosphosilicate synthétisé à 1050°C ne présente pas de porosité ; la réaction d'expansion n'a pas encore eu lieu. Pour une température supérieure ou égale à 1100°C, la porosité commence à se développer. A 1100 et 1110°C, le matériau présente une porosité micrométrique, avec une taille de pores comprise entre 100 et 900  $\mu\text{m}$  environ. Entre 1120 et 1140°C, le diamètre des pores s'accroît avec l'augmentation de la température et la porosité devient de plus en plus inhomogène. Ce phénomène est lié à plusieurs facteurs. Tout d'abord, à partir de 1120°C et d'après les analyses thermiques effectuées, le dégagement gazeux devient plus important. De plus, avec l'augmentation de la température, la viscosité du verre diminue. Ainsi, à cette température, la viscosité est telle que le gaz dégagé est piégé et les bulles se développent de façon importante dans la matrice de verre.

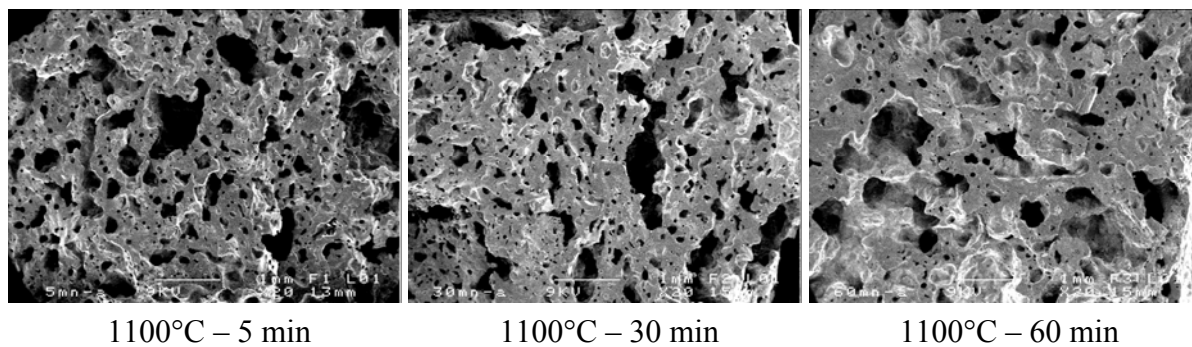


**Figure 17.3.** Morphologie des phosphosilicates synthétisés pour des températures de réaction comprises entre 1150 et 1190°C ( $\times 20$ )

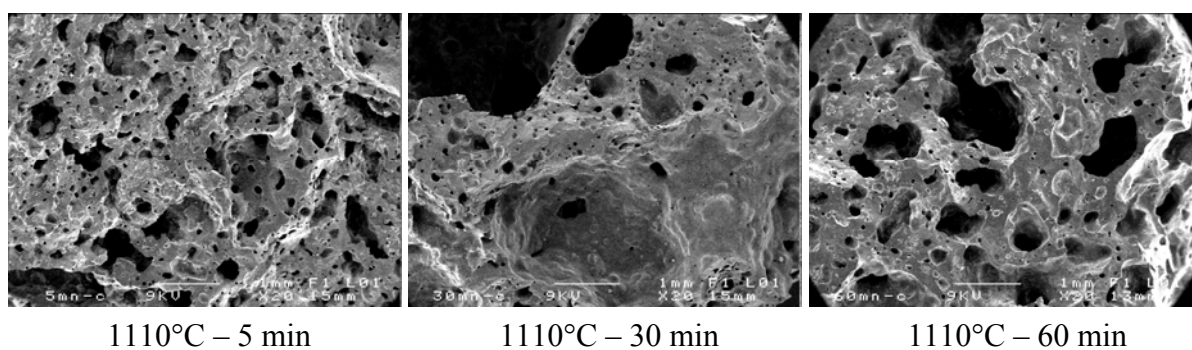
Au-delà de 1140°C, la viscosité continue de diminuer et les bulles de gaz peuvent alors se former de façon plus homogène dans le matériau fondu. La morphologie des pores est modifiée : ces derniers deviennent sphériques. Entre 1150 et 1180°C, le nombre de pores augmente pour une même surface. En ce qui concerne l'échantillon synthétisé à 1190°C, aucune porosité n'est observée. A cette température, la matrice vitreuse est complètement fondue et sa viscosité est trop faible pour permettre le piégeage du dégagement gazeux.

### 1.2.2. Influence de la durée du palier de réaction

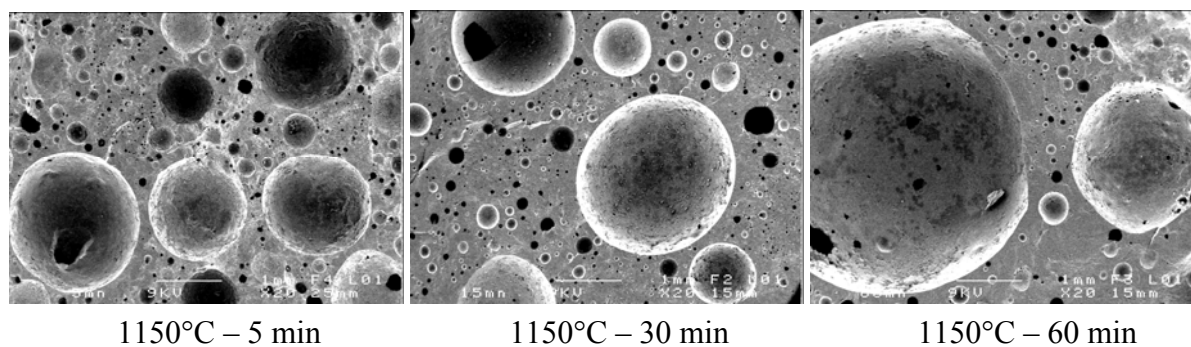
Les figures suivantes montrent l'évolution de la morphologie des échantillons en fonction de la durée du palier pour différentes températures de réaction : 1100, 1110 et 1150°C. Les micrographies ont été effectuées au grossissement ( $\times 20$ ).



**Figure 17.4.** Morphologie des phosphosilicates synthétisés à 1100°C pour des durées de palier comprises entre 5 et 60 min (×20)



**Figure 17.5.** Morphologie des phosphosilicates synthétisés à 1110°C pour des durées de palier comprises entre 5 et 60 min (×20)



**Figure 17.6.** Morphologie des phosphosilicates synthétisés à 1150°C pour des durées de palier comprises entre 5 et 60 min (×20)

Entre 1100 °C et 1110 °C, la porosité et la taille des pores restent du même ordre de grandeur. D'après les figures 17.4 et 17.5, aucune variation significative de la porosité n'est observée en fonction de la durée de palier. A l'inverse, à 1150 °C, la porosité devient de plus en plus inhomogène quand la durée de palier augmente ; les pores ont alors tendance à s'agglomérer pour former des bulles de gaz plus volumineuses (figure 17.6).

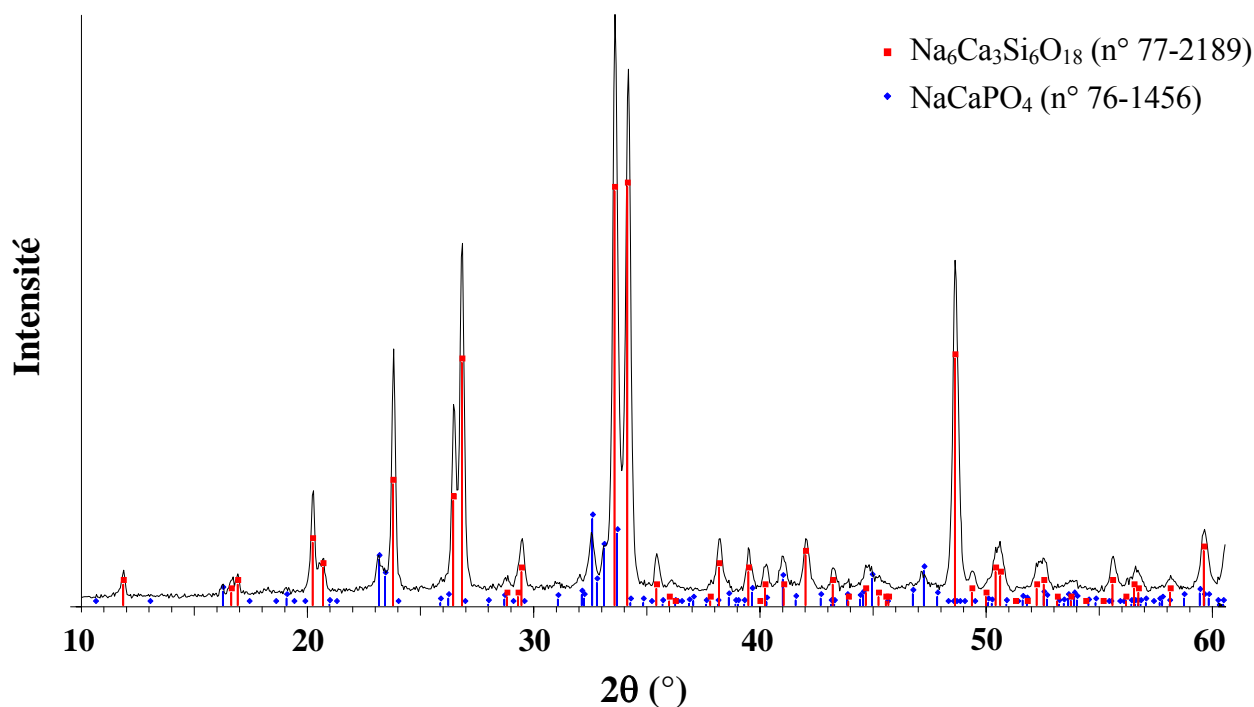
Les différences morphologiques observées au niveau de la porosité (influence de la température et de la durée du palier de réaction) s'explique par le mode d'oxydation du nitrure d'aluminium. Entre 1100 et 1110 °C, l'oxydation du nitrure d'aluminium se produit d'une part avec l'oxygène atmosphérique (les poudres ne sont pas tassées) et d'autre part avec l'oxygène (ou l'eau) adsorbé sur les grains de poudre. En effet, d'après les analyses thermiques effectuées (figure 17.1), l'oxydation du nitrure d'aluminium sous O<sub>2</sub> commence à 900°C et s'accélère aux environs de 1100°C. Aussi, à 1100°C, l'oxydation du nitrure d'aluminium est homogène et limitée car l'oxygène réactif est présent en faible quantité dans le mélange de poudre. A partir de 1140°C, l'oxyde Na<sub>2</sub>O entre également en jeu dans la réaction, ce qui favorise un dégagement gazeux plus important.

Pour des applications en tant que biomatériaux, une porosité homogène et interconnectée, ainsi qu'une taille de pores comprise entre 100 et 600 µm favorisent la colonisation cellulaire, et servent de support à la régénération osseuse. En tenant compte de ces critères, les matériaux les plus appropriés sont donc ceux synthétisés entre 1100 et 1130°C.

## **2. Caractérisations physico-chimiques des échantillons**

### **2.1. Diffraction des rayons X**

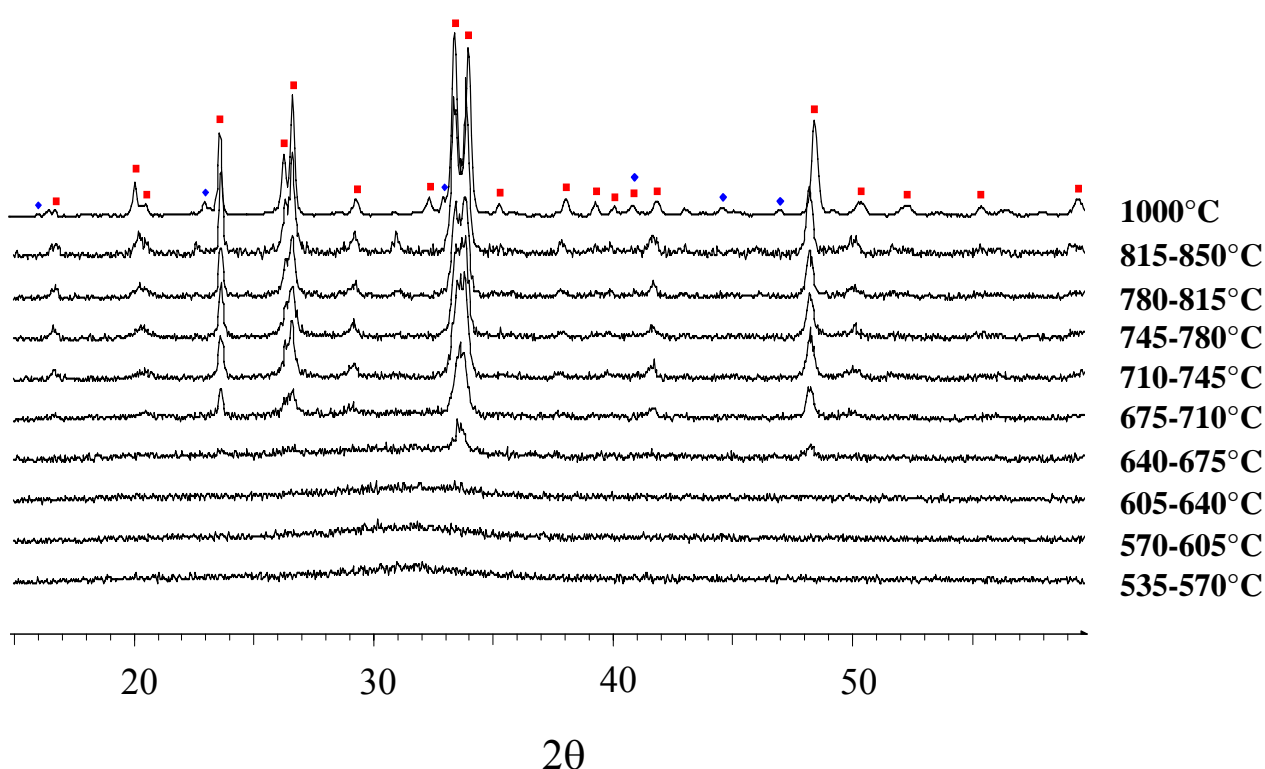
La diffraction des rayons X a été utilisée pour déterminer la nature des phases cristallines présentes dans les phosphosilicates poreux synthétisés. La figure 17.7 représente le diffractogramme obtenu pour l'échantillon 1110°C-5min, préalablement broyé. Les diagrammes obtenus pour les échantillons synthétisés à 1100, 1120 et 1130°C ne sont pas représentés car aucune différence n'a été observée par rapport à la figure 17.7.



**Figure 17.7.** Diffractogramme de l'échantillon 1110°C – 5 min

La plupart de la littérature traitant de la transformation du Bioglass® 45S5 lors de traitement thermique nous indique la formation de Na<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>, comme phase cristalline majoritaire [147-148]. L'existence d'une seconde phase mineure est souvent suggérée pour respecter la stoechiométrie initiale du verre [149]. Cependant, la structure des cristaux apparaissant lors du traitement thermique du Bioglass® reste toujours incertaine. En effet, récemment, il a été proposé Na<sub>6</sub>Ca<sub>3</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub> plutôt que Na<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>, comme phase cristalline majoritaire [150]. Deux arguments sont en faveur de Na<sub>6</sub>Ca<sub>3</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub> par rapport à Na<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub> : premièrement, la composition du Bioglass® est plus proche de celle de Na<sub>6</sub>Ca<sub>3</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub> ; deuxièmement, la méthode de Rietveld montre un meilleur accord du diagramme de diffraction expérimental avec celui calculé pour Na<sub>6</sub>Ca<sub>3</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub> [151-152]. Les travaux les plus récents confirment la formation de Na<sub>6</sub>Ca<sub>3</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub> comme phase cristalline majoritaire et supposent l'apparition d'une nouvelle phase cristalline phosphatée Na<sub>2</sub>Ca<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> (fiche JCPDS n°32-1053) après traitement thermique du Bioglass® 45S5 [151]. Sur la figure 17.7, les pics principaux sont associés aux phases Na<sub>6</sub>Ca<sub>3</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub> (en rouge) et NaCaPO<sub>4</sub> (en bleu), par comparaison aux diagrammes de référence (fiches JCPDS n° 77-2189 et n° 76-1456 respectivement). Aucune raie de diffraction n'est associée à la présence d'aluminium (sous forme de nitrure ou d'oxyde) dans le matériau.

Afin de mieux comprendre l'évolution de la cristallisation dans la matrice de nos matériaux, une analyse par thermo-diffractométrie a été effectuée. La thermo-diffractométrie a été réalisée sur un diffractomètre Bruker D5005, équipé d'une chambre de chauffage Anton Paar HTK1200. Le rayonnement X est produit par une anticathode de cuivre dont les raies  $K_{\alpha 1}$  ( $\lambda_{Cu} = 1,54056\text{\AA}$ ) et  $K_{\alpha 2}$  ( $\lambda_{Cu} = 1,54439\text{\AA}$ ) sont isolées grâce à un monochromateur arrière. Les acquisitions sont réalisées sur un domaine de  $10$  à  $60^\circ$  ( $2\theta$ ), avec un pas de  $0,04^\circ$   $2\theta$  et sous flux d'azote. La montée en température a suivi une rampe de  $35^\circ/\text{h}$  et chaque diffractogramme enregistré couvre une gamme de  $36^\circ\text{C}$ .

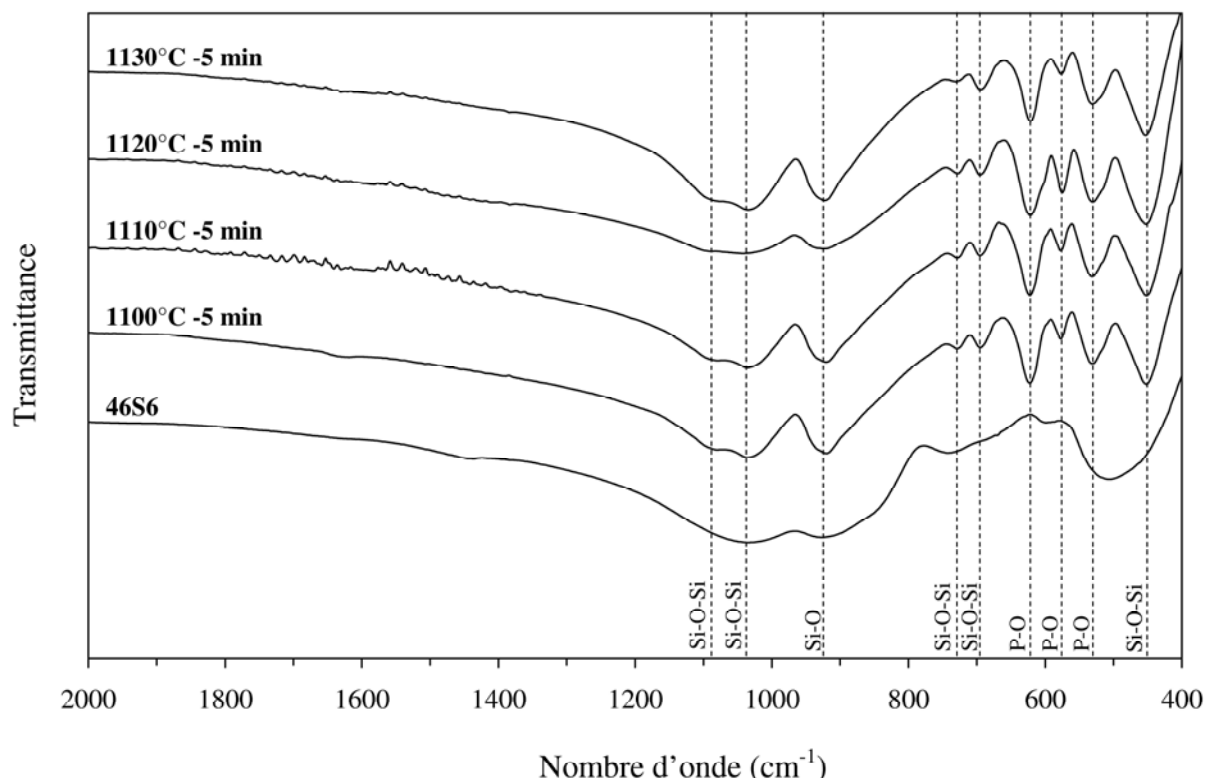


**Figure 17.8.** Thermo-diffractogrammes du verre 46S6

La figure 17.8 représente les diffractogrammes du verre en cours de traitement thermique, enregistrés entre  $500$  et  $900^\circ\text{C}$  ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ). Le diagramme à  $1000^\circ\text{C}$  est celui obtenu pour la caractérisation du phosphosilicate poreux synthétisé à cette même température. Entre  $535$  et  $630^\circ\text{C}$ , un halo de diffraction, caractéristique des matériaux amorphes, est observé. La cristallisation du 46S6 débute aux environs de  $640^\circ\text{C}$ . Au cours du chauffage, la cristallisation augmente, avec l'apparition de nouvelles raies de diffraction et l'augmentation de leur intensité. La phase qui cristallise est  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ ; la seconde phase  $\text{NaCaPO}_4$  cristallise entre  $815$  et  $850^\circ\text{C}$ .

## 2.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge pour le verre bioactif 46S6 et les phosphosilicates poreux 1100, 110, 1120 et 1130°C – 5 min sont présentés sur la figure 17.9. D'une manière générale, les spectres obtenus pour les phosphosilicates poreux montrent très peu de différences entre eux.



**Figure 17.9.** Spectres IR du 46S6 et des phosphosilicates poreux pour différentes températures de réaction

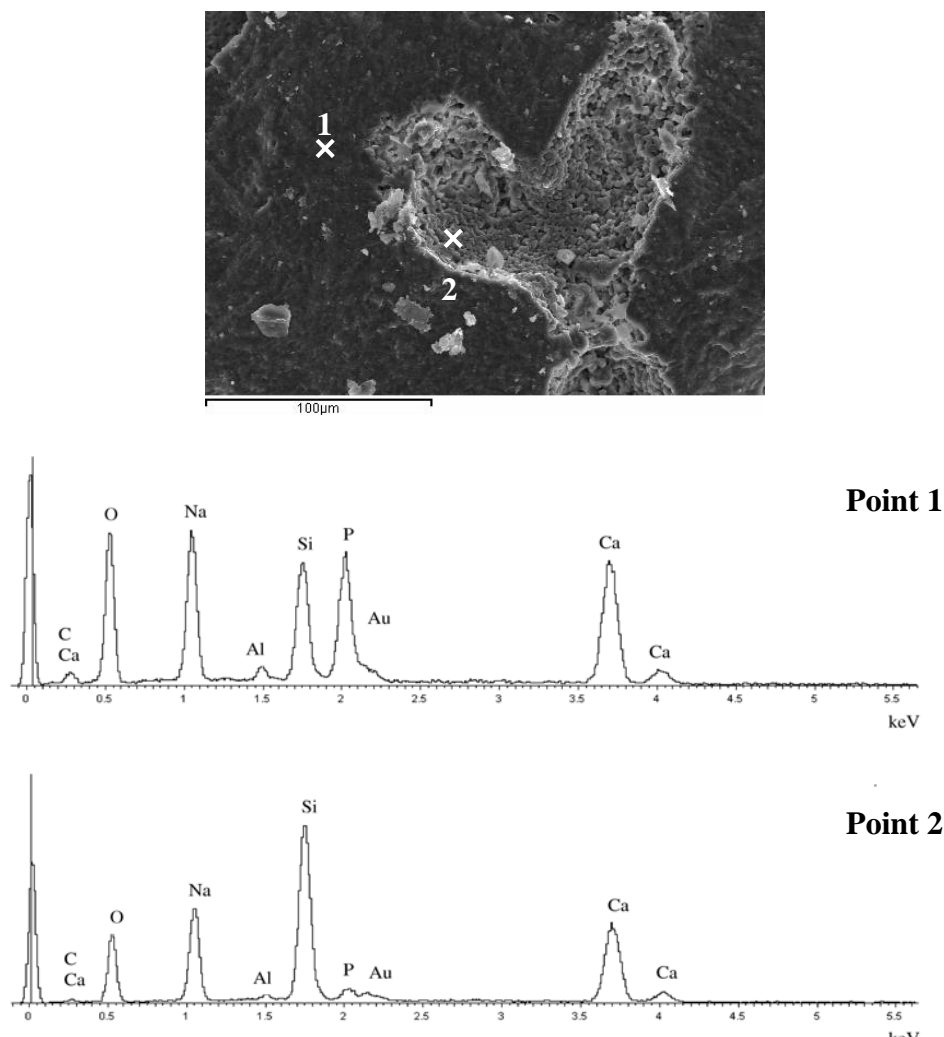
Les principales bandes d'absorption du 46S6 sont observées à 1036, 923 et 506  $\text{cm}^{-1}$ . Elles sont attribuées aux vibrations d'élongation Si-O-Si et Si-O et aux vibrations de déformation angulaire Si-O-Si, respectivement. Les bandes Si-O-Si à 745 et 690  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongation. Après traitement thermique, la bande large à 1034  $\text{cm}^{-1}$  s'est scindée en deux bandes grâce à la combinaison de tétraèdres de silicium isolés [149]. Dans le même temps, la bande à 927  $\text{cm}^{-1}$ , attribuée aux liaisons Si-O, augmente en intensité. Cette augmentation est provoquée par la cristallisation de la phase majoritaire  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  [151].



La présence d'un phosphate de calcium cristallin est confirmée par les nouvelles bandes observées à 620, 580 et 530  $\text{cm}^{-1}$ . En effet, les bandes à 620 et 580  $\text{cm}^{-1}$  sont caractéristiques des liaisons P-O en phase cristalline, ce qui est en accord avec l'identification de la phase  $\text{NaCaPO}_4$  par diffraction des rayons X.

### 2.3. Analyse des surfaces par EDS

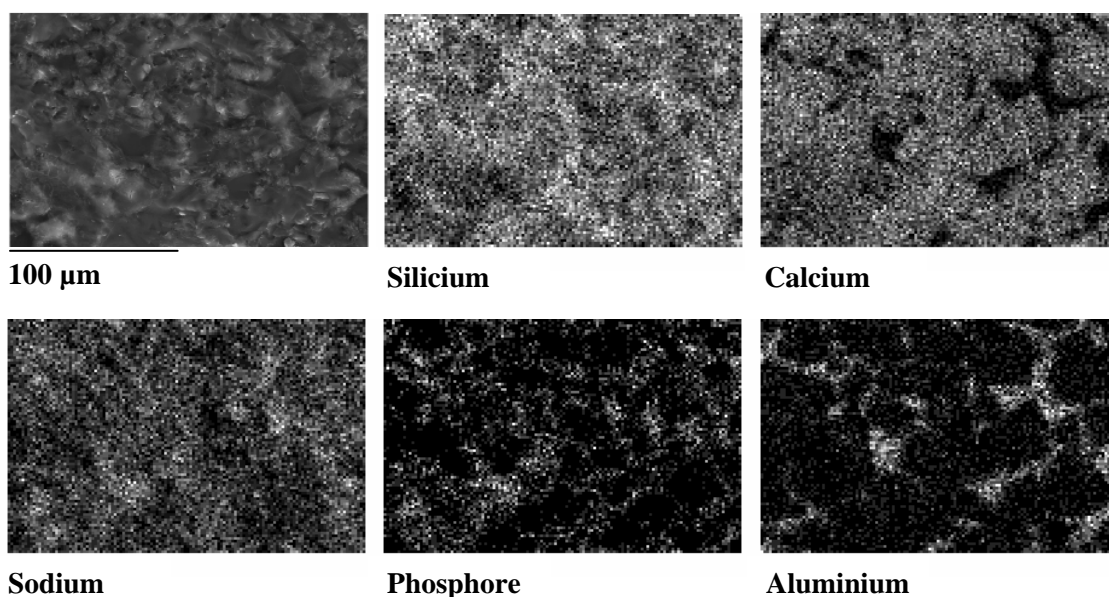
La surface de nos échantillons a été analysée par EDS. La composition globale des différents échantillons est en accord avec la composition du 46S6. L'aluminium est détecté sur l'ensemble des matériaux dans des faibles teneurs.



**Figure 17.10.** Analyse par EDS de la surface de l'échantillon 1100°C – 5 min

D'après les analyses par EDS, il existe deux zones dans nos échantillons. La principale différence entre ces deux zones est la présence de phosphore ou non. A titre d'illustration, la figure 17.10 représente l'analyse de la surface de l'échantillon 1100°C - 5min. Deux analyses ponctuelles ont été effectuées, la première à l'intérieur d'un pore et la seconde à l'extérieur. Le phosphore n'est donc pas réparti de façon homogène dans l'échantillon, mais se situe uniquement dans certaines zones du matériau.

La cartographie des éléments Si, Ca, Na, P et Al, réalisée à la surface du phosphosilicate 1100°C – 5min, permet de visualiser plus globalement la répartition du phosphore (figure 17.11). Les zones les plus claires correspondent aux zones les plus riches en l'élément étudié. Ainsi, l'aluminium et le phosphore sont répartis de façon inhomogène à la surface de notre échantillon, mais ces deux éléments ne sont pas présents dans les mêmes zones. Le calcium est également absent dans les zones riches en aluminium. De la même manière, le silicium est présent en plus faible quantité dans les zones riches en phosphore.



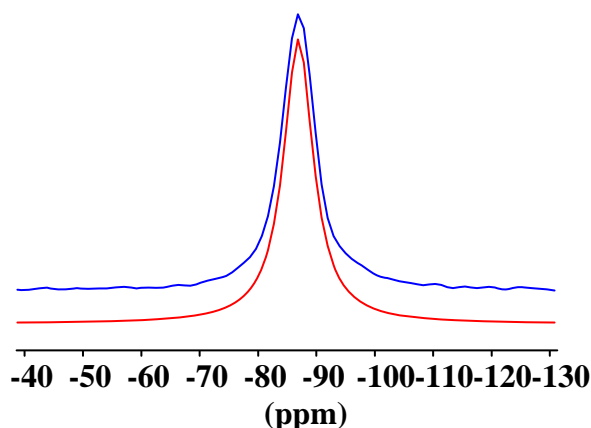
**Figure 17.11.** Cartographie par EDS d'une zone de la surface de l'échantillon 1100°C - 5min

L'analyse des surfaces par EDS confirme la présence dans le matériau des deux phases détectées lors de l'analyse par diffraction des rayons X. Une étude similaire a été conduite pour les phosphosilicates 1110, 1120 et 1130°C – 5 min et les conclusions sont les mêmes : deux phases coexistent dans les différents échantillons.

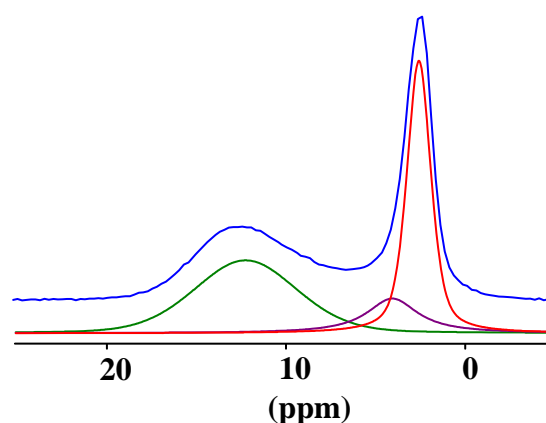
## 2.4. Etude structurale par RMN du solide

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 12, la formation de la couche d'apatite à la surface des vitro-céramiques bioactives est principalement provoquée par la phase vitreuse et peut être diminuée si la vitro-céramique est complètement cristallisée [122]. Aussi, la connaissance de la structure des vitro-céramiques et de la phase vitreuse résiduelle est d'une importance majeure, car le taux de relargage des différents éléments est principalement déterminé par cette dernière.

La figure 17.12 représente le spectre RMN-MAS  $^{29}\text{Si}$  du phosphosilicate 1100°C - 5min (en bleu), ainsi que le résultat de sa déconvolution (en rouge). On constate que le spectre est déconvolué avec une seule gaussienne, centrée à -86,9 ppm et associée aux espèces  $\text{Q}^2$ . Après traitement thermique, la largeur à mi-hauteur de la raie est moins large que celle du 46S6 (6,4 ppm contre 11,4 ppm pour la composante  $\text{Q}^2$  du verre).



**Figure 17.12.** Spectre RMN  $^{29}\text{Si}$  du phosphosilicate 1100°C – 5 min



**Figure 17.13.** Spectre RMN  $^{31}\text{P}$  du phosphosilicate 1100°C – 5 min

Des différences significatives de déplacement chimique sont observées entre les espèces  $\text{Q}^2$  présentes dans les verres et dans les vitro-céramiques. Les résonnances des phases cristallines sont plus fines et à des déplacements chimiques plus élevées que celles observées dans les verres. Il y a donc des différences structurales notables dans l'environnement des espèces  $\text{Q}^2$  présentes dans les verres ou dans les cristaux, même si la connectivité des tétraèdres  $\text{SiO}_4$  est identique.

Ces différences sur la résonnance du silicium peuvent s'expliquer par des distorsions géométriques dans les verres, telles que des distances Si-O plus longues, des angles Si-O-Si plus aigus ou encore des liaisons plus faibles entre les atomes d'oxygènes et les cations modificateurs [123].

La figure 17.13 représente le spectre RMN-MAS  $^{31}\text{P}$  du phosphosilicate 1100°C - 5min (en bleu), ainsi que les résultats de sa déconvolution (courbes en rouge, vert et violet). Le spectre  $^{31}\text{P}$  est décomposé à l'aide de 3 gaussiennes, centrées à 12,3 ppm, 4 ppm et 2,5 ppm, et représentant respectivement 43, 14 et 43 % des populations en espèces présentes. Avant traitement thermique le spectre RMN du 46S6 présentait une seule composante, centrée à environ 8,6 ppm, caractéristique des phosphores dans un environnement orthophosphate (les groupements  $\text{PO}_4^{3-}$  sont entourés des cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et ne présentent pas d'association préférentielle avec l'un ou l'autre des cations [125]). Après traitement thermique, l'environnement des phosphores est fortement modifié ; un tel traitement aboutit à la formation de phosphates cristallins. Dans la littérature, deux résonnances situées aux environs de 13,8-15,5 ppm et 2,4-2,9 ppm ont été attribuées aux phosphores, respectivement dans un environnement sodium orthophosphate ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) et dans un environnement sodium pyrophosphate ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) [125, 130, 154]. De plus, le déplacement chimique en  $^{31}\text{P}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  est compris entre 0 et 4 ppm [125] et celui de  $\text{NaCaPO}_4$  à 2,1 ppm. Il est donc difficile de dire si la résonnance située à 2,5 ppm correspond à la présence de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  plutôt qu'à celle de  $\text{NaCaPO}_4$  ou de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Cependant, la présence de phosphores dans un environnement orthophosphate est claire avec la résonnance à 12,3 ppm. Pour cette résonnance, les groupements  $\text{PO}_4^{3-}$  sont alors entourés préférentiellement des cations  $\text{Na}^+$ .

L'étude par diffraction des rayons X nous apporte la preuve claire de la présence de  $\text{NaCaPO}_4$ , mais pas de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . En effet, les raies de diffraction de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  se superposent avec celles de  $\text{NaCaPO}_4$  ou de  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  et aucune n'apparaît comme caractéristique du diagramme de diffraction de notre matériau. En ce qui concerne  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , ce composé n'est pas identifié sur le diagramme des rayons X de notre matériau.

Pour conclure sur la structure de notre matériau, deux phases cristallines ont été clairement identifiées ; il s'agit de  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  et de  $\text{NaCaPO}_4$ . Ces deux phases ont mises en évidence par diffraction des rayons X et par RMN du solide. Cette dernière méthode indique la présence de groupements orthophosphates résiduels, initialement présents dans la matrice vitreuse.

### 3. Etude après immersion dans le SBF

L'objectif de cette étude après immersion est de mettre en évidence la réactivité chimique de nos matériaux et plus particulièrement leur bioactivité. Elle va permettre d'identifier et de quantifier les échanges ioniques ayant eu lieu entre le matériau et le milieu d'immersion, et plus particulièrement de savoir s'il y a eu un relargage d'aluminium vers la solution. En effet, le relargage de cet élément n'est pas souhaité pour une application biomédicale.

#### 3.1. Analyse du SBF par ICP-OES

Les échantillons sélectionnés ont été immergés dans le SBF pendant 5 et 15 jours, suivant les conditions décrites dans le Chapitre 5. Les essais *in vitro* ont été réalisés en duplicata ; les concentrations ioniques figurant dans le tableau 17.1 sont les valeurs de concentration moyennes.

Aucune trace d'aluminium n'a été détectée dans les solutions de SBF après 5 et 15 jours d'immersion, quel que soit le matériau étudié. Un relargage de calcium et de silicium est observé du matériau vers le SBF. Dans le cas du calcium, la concentration mesurée augmente d'environ 40 ppm en moyenne entre 5 et 15 jours d'immersion. Le relargage du calcium en grande quantité (environ 160 ppm) se déroule donc pendant les premiers jours d'immersion. De la même manière, environ 50 ppm de silicium sont relargués pendant les 5 premiers jours d'immersion ; après 15 jours d'immersion, la concentration en silicium n'a pas évolué. A l'inverse, à l'issue des 5 jours d'immersion, la concentration en phosphore dans le SBF a diminué, ce qui signifie que le phosphore présent dans la solution a été adsorbé à la surface des matériaux. Après 15 jours d'immersion, la concentration en phosphore a continué de diminuer. La concentration en magnésium, qui était stable à 5 jours d'immersion, a également légèrement diminué (5 ppm en moyenne) après 15 jours. Les échanges ioniques entre les phosphosilicates et le SBF ont donc lieu de manière intense durant les premiers jours d'immersion. Entre 5 et 15 jours d'immersion, les concentrations en calcium, phosphore et magnésium continuent d'évoluer dans une moindre mesure, mais cette évolution peut être le témoin de la formation d'une couche de phosphate de calcium à la surface de nos matériaux.

Echantillon immergé		Concentrations mesurées dans le SBF après immersion (ppm)				
		Ca	P	Si	Mg	Al
Concentration initiale dans le SBF (ppm)		100	31	0	36	0
1100°C 5min	5 j	259	15	55	35	0
	15 j	298	7	52	30	0
1110°C 5min	5 j	256	16	52	35	0
	15 j	301	7	53	31	0
1120°C 5min	5 j	264	13	56	36	0
	15 j	305	8	54	31	0
1130°C 5min	5 j	263	18	54	35	0
	15 j	308	10	52	31	0

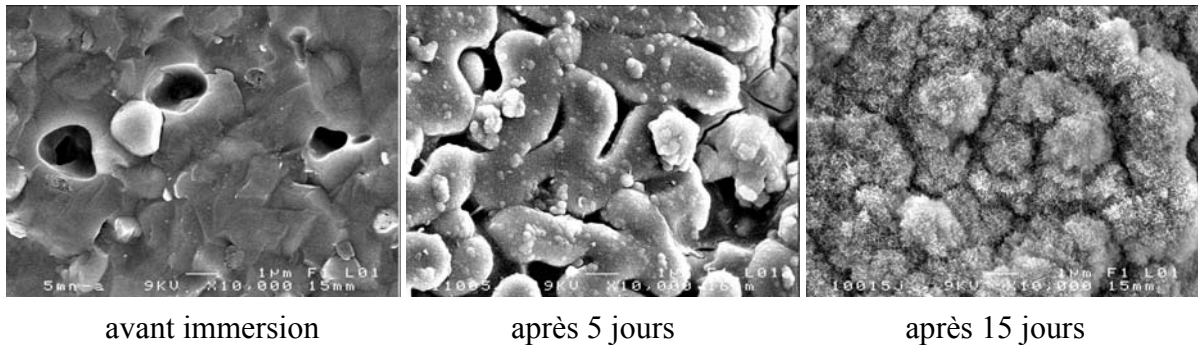
**Tableau 17.1.** Concentrations élémentaires dans le SBF après 5 et 15 jours d'immersion

### 3.2. Evolution de la morphologie des échantillons

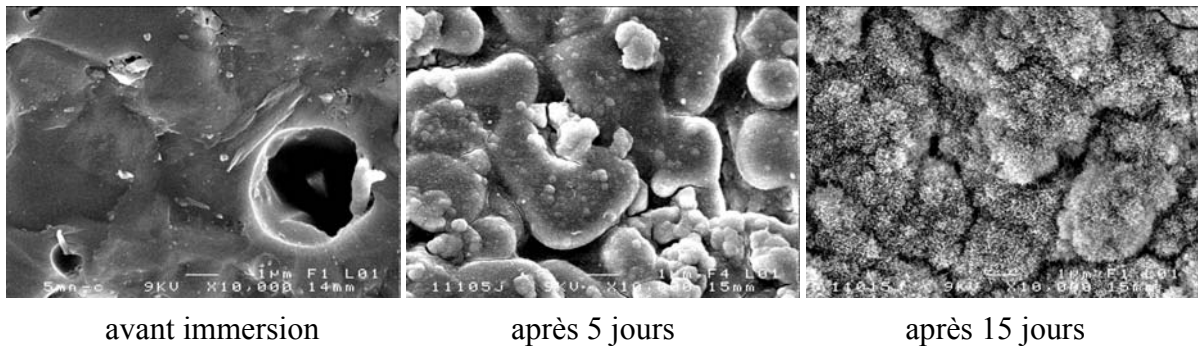
#### 3.2.1. Observation des surfaces par MEB

Après immersion dans la solution de SBF, des modifications morphologiques ont été observées à la surface de nos échantillons. Les figures suivantes présentent les micrographies de la surface des phosphosilicates poreux (1100, 1110, 1120 et 1130°C -5 min) avant et après immersion pour les délais de 5 et 15 jours, pour un grossissement ( $\times 10000$ ). Les micrographies des surfaces ont été prises à l'intérieur des pores, afin d'observer le comportement « réel » des matériaux lors des essais *in vitro*. En effet, les échantillons ont été découpés et polis afin de pouvoir être caractérisés et cette préparation modifie leur état de surface. Les surfaces de l'intérieur des pores sont vierges de toutes préparations et sont donc plus représentative du comportement du matériau.

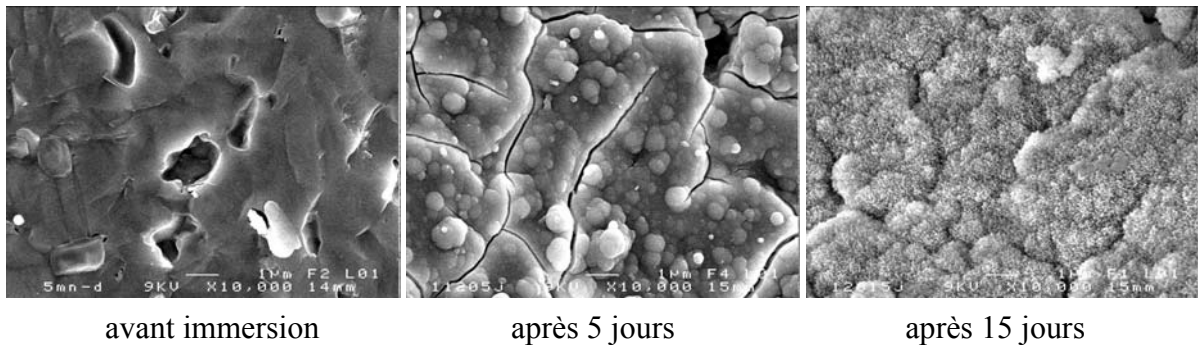
Après 5 jours d'immersion, on observe la formation d'une couche à la surface des matériaux, visible par la présence de craquelures. Cette couche présente un aspect globuleux et irrégulier. Après 15 jours, la morphologie de cette couche a évolué : elle est recouverte de cristaux, semblables aux cristaux d'hydroxyapatite. Elle présente un aspect irrégulier également.



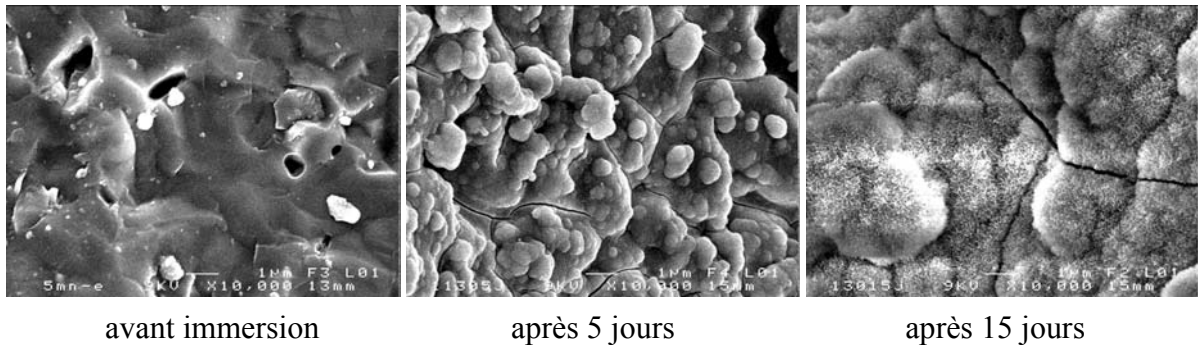
**Figure 17.15.** Evolution de la surface du phosphosilicate 1100°C – 5 min ( $\times 10.000$ )



**Figure 17.16.** Evolution de la surface du phosphosilicate 1110°C – 5 min ( $\times 10.000$ )



**Figure 17.17.** Evolution de la surface du phosphosilicate 1120°C – 5 min ( $\times 10.000$ )

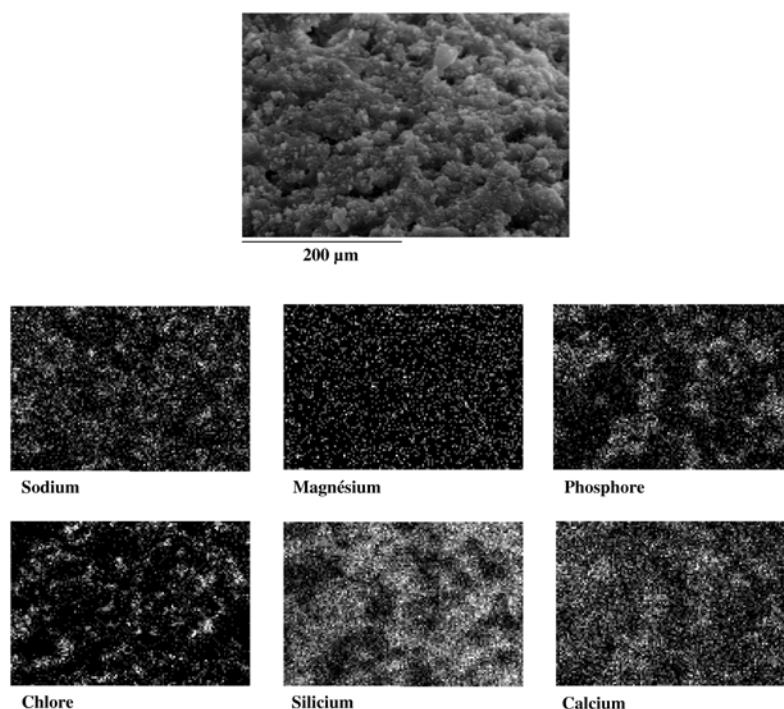


**Figure 17.18.** Evolution de la surface du phosphosilicate 1130°C – 5 min ( $\times 10.000$ )

### 3.2.2. Analyse de la surface des matériaux par EDS

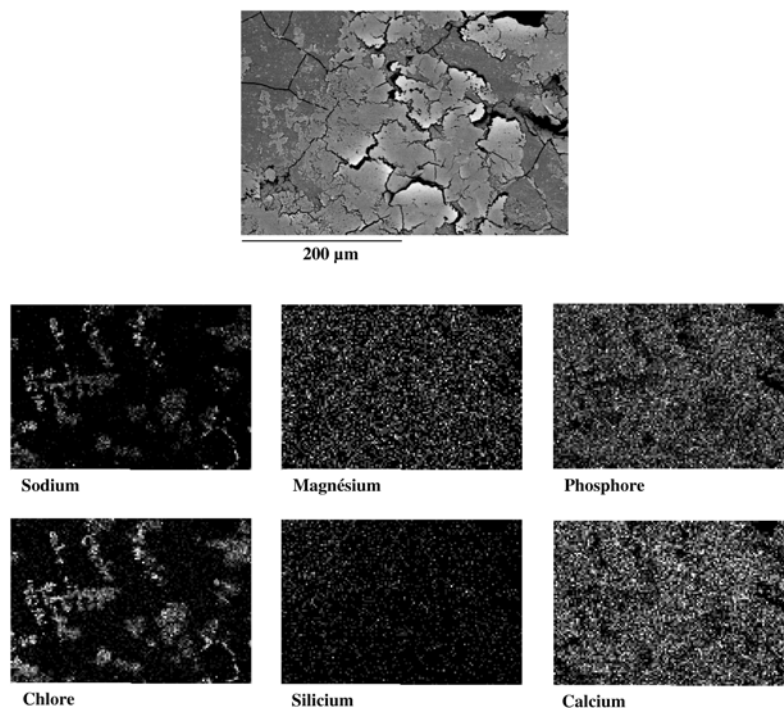
L'analyse par EDS permet de préciser la nature de la couche formée en surface des phosphosilicates. La figure 17.20 représente une cartographie de la surface du phosphosilicate 1120°C – 5 min après 5 jours d'immersion. La cartographie de la surface du phosphosilicate 1120°C – 5 min après 15 jours d'immersion est présentée sur la figure 17.21.

Les éléments ne sont pas répartis de façon homogène à la surface de l'échantillon. Certaines zones sont riches en sodium et chlore, d'autres en calcium et phosphore. La formation de cristaux de NaCl a certainement lieu lors du séchage des échantillons. En accord avec les micrographies faites au MEB, on observe après 5 jours d'immersion dans le SBF la formation d'une couche, à la surface des échantillons, riche en calcium et phosphore. Cependant à l'issue de ce délai, cette couche ne s'est pas développée de façon uniforme à la surface des phosphosilicates. Après 15 jours d'immersion, la formation d'une couche riche en calcium et en phosphore est confirmée ; ces deux éléments sont présents majoritairement sur l'ensemble de la surface des échantillons. On constate également la présence de cristaux de NaCl ; ces derniers se sont formés sur la couche d'hydroxyapatite, certainement lors du séchage des échantillons.



**Figure 17.20.** Cartographie par EDS de l'échantillon 1120°C – 5min après 5 jours dans le SBF





**Figure 17.21.** Cartographie par EDS de l'échantillon 1120°C – 5min après 15 jours dans le SBF

#### 4. Bilan de cette étude

L'objectif de cette étude était de mettre au point un nouveau type de biomatériau poreux, synthétisé à partir d'un mélange verre bioactif broyé - nitrure d'aluminium. Une fois les paramètres de synthèse optimisés, les échantillons présentant les caractéristiques morphologiques recherchées ont été caractérisés par différentes méthodes physico-chimiques et leur comportement a été évalué lors de tests *in vitro*.

Ainsi, pour des applications en tant que biomatériaux, les matériaux les plus appropriés s'avèrent être ceux synthétisés entre 1100 et 1130°C. Ces derniers présentent une structure proche de celle du 45S5 après traitement thermique ; il s'agit de vitrocéramiques contenant deux phases :  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  et  $\text{NaCaPO}_4$ . Les études *in vitro* par immersion des échantillons dans une solution de SBF ont montré la présence d'importants échanges ioniques pour des délais de 5 et 15 jours.

Cependant, aucun relargage d'aluminium du matériau vers la solution de SBF n'a été détecté. Les études par MEB et EDS des échantillons après immersion ont mis en évidence la formation d'une nouvelle phase en surface, riche en Ca et P, dont la morphologie est caractéristique des cristaux d'hydroxyapatite. Des cristaux de NaCl ont également été formés à la surface des échantillons, très probablement lors du séchage de ces derniers.

Pour conclure, les phosphosilicates poreux obtenus à partir du nitrure d'aluminium présentent deux critères recherchés pour des applications en tant que biomatériaux : porosité et bioactivité. La présence d'aluminium est néanmoins un frein majeur à leur utilisation comme matériaux de comblement osseux. C'est principalement pour cette raison que nous avons par la suite développé un autre type de phosphosilicate poreux obtenu cette fois à partir du nitrure de titane.



## Chapitre 18

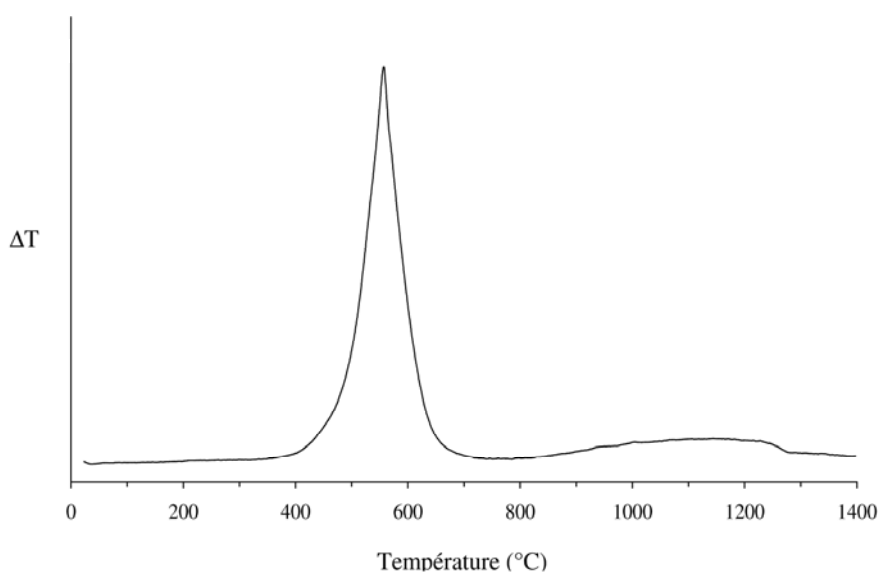
### Matériaux poreux obtenus avec le nitrure de titane

Ce chapitre a pour but de présenter les phosphosilicates synthétisés à partir de la réaction entre le verre 46S6 et le nitrure de titane. De nombreux essais d'expansion ont été réalisés ; nous avons ensuite choisi les matériaux présentant les caractéristiques morphologiques les plus intéressantes pour optimiser les paramètres de synthèse et effectuer les différentes caractérisations physico-chimiques.

#### 1. Optimisation des paramètres de synthèse

##### 1.1. Températures caractéristiques

La figure 18.1 représente la courbe d'analyse thermique différentielle obtenue pour le nitrure de titane sous flux d' $O_2$ . L'oxydation du nitrure de titane débute à partir de  $400^\circ C$  et s'accélère aux environs de  $520^\circ C$ .



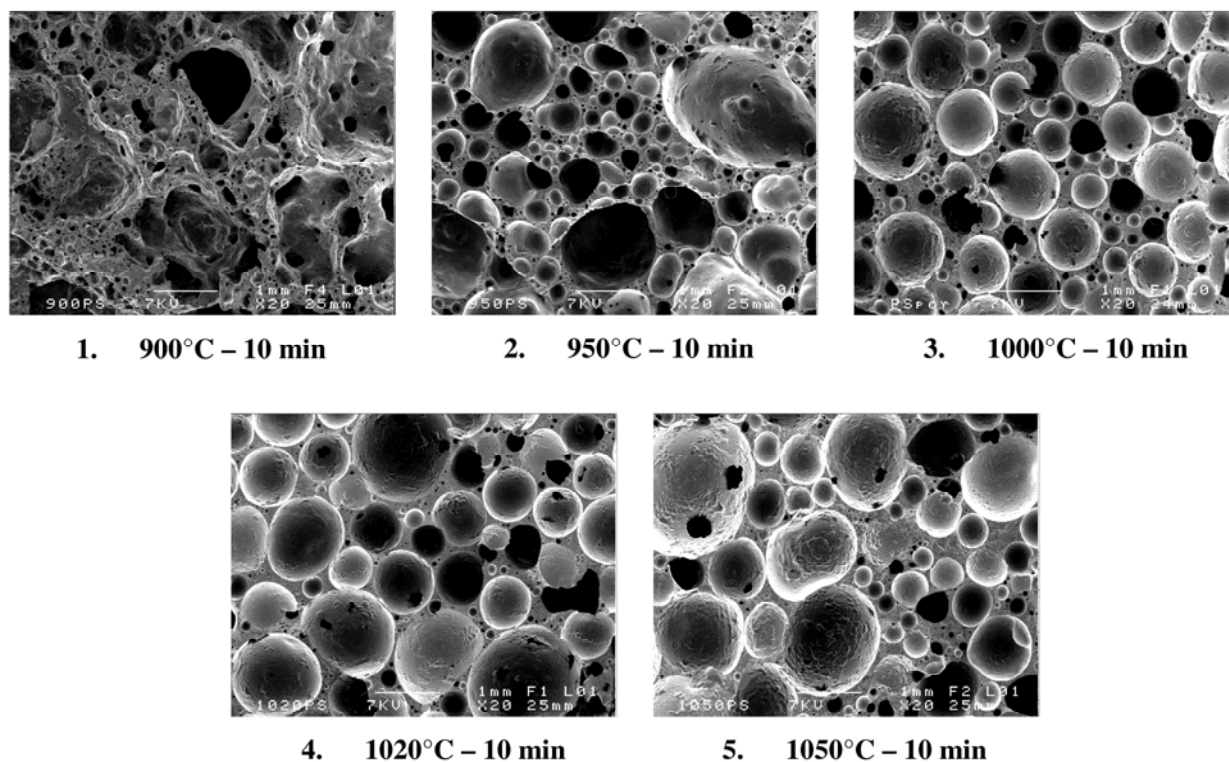
**Figure 18.1.** Analyse thermique différentielle de TiN sous  $O_2$

## 1.2. Etude de la morphologie des matériaux synthétisés

### 1.2.1. Influence de la température de réaction

L'objectif de cette étude est d'optimiser les paramètres de synthèse du matériau, en observant par microscopie électronique à balayage l'évolution de la morphologie des matériaux, synthétisés avec le nitrure de titane. Nous avons notamment étudié l'évolution de la porosité du matériau en fonction de la température de réaction.

La figure 18.2 présente les micrographies ( $\times 20$ ) de la surface des phosphosilicates obtenus par réaction d'expansion. Toutes les synthèses ont été effectuées en suivant le même protocole (Chapitre 16). La durée du palier de la réaction est fixée à 10 min et seule la température du palier varie. Cette dernière est comprise entre 900 et 1050°C.



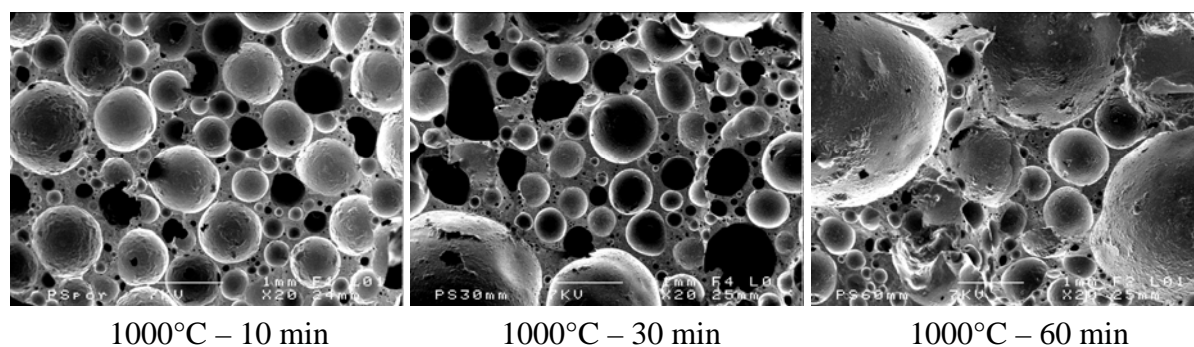
**Figure 18.2.** Morphologie des phosphosilicates synthétisés pour des températures de réaction comprises entre 900 et 1050°C ( $\times 20$ )

A l'issue du traitement thermique à 900°C, le matériau obtenu présente une morphologie différente de celle observée pour les autres températures. En effet, à partir de 950°C, les pores sont parfaitement sphériques. Cette morphologie est caractéristique de la réaction du nitrure avec l'oxyde de zinc, présent de façon homogène dans la matrice vitreuse. Ainsi, à 900°C, la température n'est pas assez élevée pour que cette réaction soit complète.

Avec l'augmentation de la température de réaction, la matrice vitreuse commence à fondre et la viscosité du verre diminue. A partir de 1000°C, la viscosité est alors telle que le gaz dégagé est piégé dans la matrice vitreuse et les bulles se développent de façon importante dans la matrice de verre, d'où la création de porosité. Cependant, à 1020°C, la viscosité du verre a encore diminué ce qui a entraîné une augmentation du volume des bulles de gaz. La porosité se forme alors de façon moins homogène avec l'augmentation de la taille des macropores. A 1050°C, ce phénomène est exacerbé par l'augmentation de la température de réaction.

### 1.2.2. Influence de la durée du palier de réaction

La figure 18.3 montre l'évolution de la morphologie des échantillons en fonction de la durée du palier (10, 30 ou 60 min) pour une température de réaction fixée à 1000°C. Les micrographies ont été effectuées au grossissement  $\times 20$ .



**Figure 18.3.** Morphologie des phosphosilicates synthétisés à 1000°C pour des durées de palier de 10, 30 et 60 min ( $\times 20$ )

Avec l'augmentation de la durée du palier de réaction, la porosité tend à devenir de plus en plus inhomogène. En effet, les bulles de gaz qui se développent dans la matrice vitreuse ont alors tendance à s'agglomérer pour former des bulles plus volumineuses et la taille des macropores augmentent.

D'après les résultats précédents, le matériau présentant les meilleures caractéristiques morphologiques est celui synthétisé à 1000°C avec un temps de palier de 10 min. En effet, sa matrice présente une porosité homogène, comprenant des macropores et des micropores.

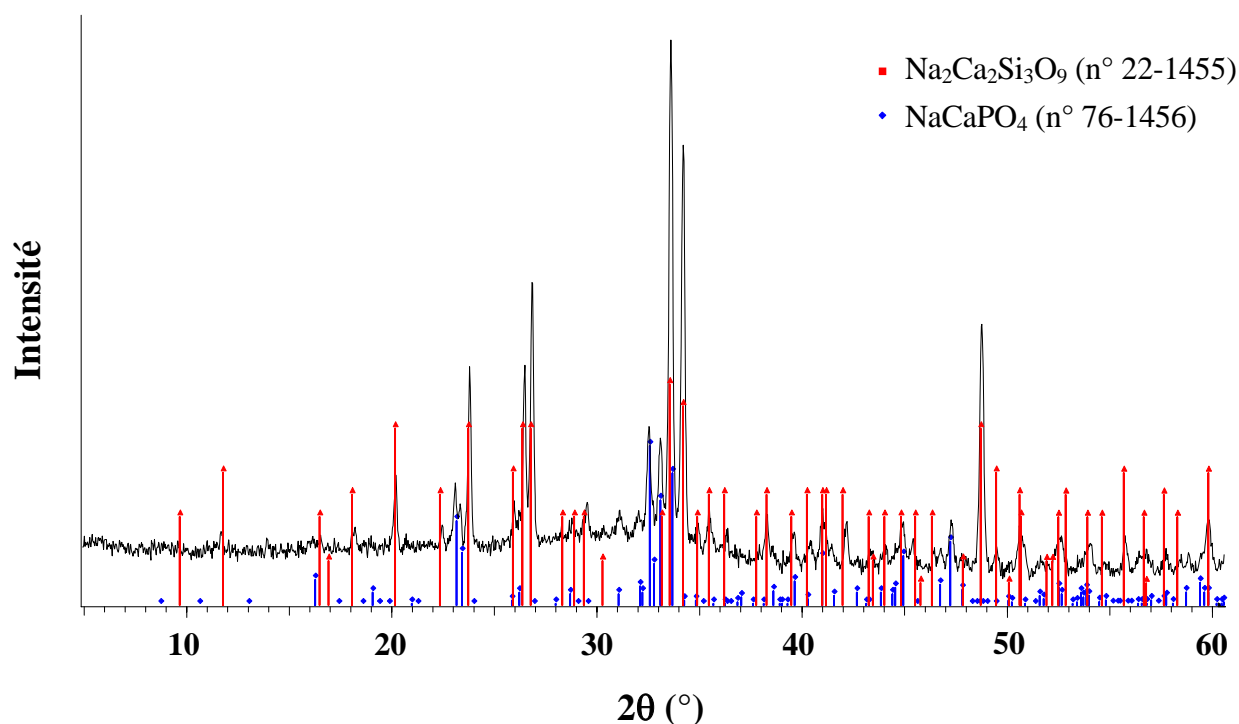
## **2. Caractérisations physico-chimiques des échantillons**

### **2.1. Diffraction des rayons X**

La diffraction des rayons X a été utilisée pour déterminer la nature des phases cristallines présentes dans les phosphosilicates poreux synthétisés. La figure 18.4 représente le diffractogramme obtenu pour l'échantillon 1000°C-10°C/min-10 min, préalablement broyé.

Contrairement, à ce qui a été observé pour les phosphosilicates poreux synthétisés avec le nitrure d'aluminium (Chapitre 17), les pics principaux identifiés sont associés à la phase  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  (en rouge) et non à  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ . Cette identification est en accord avec la littérature qui indique la formation de  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  (fiche JCPDS n°22-1455), comme phase cristalline majoritaire, lors de traitements thermiques sur le Bioglass® 45S5 [147-148].

Nous observons également, sur la figure 18.4, la présence des raies de diffraction caractéristiques de la phase  $\text{NaCaPO}_4$  (en bleu). Cette phase a été également identifiée lors de l'analyse par DRX des phosphosilicates synthétisés à partir de nitrure d'aluminium. Aucune raie de diffraction associée à la présence de titane (sous forme de nitrure ou d'oxyde) dans le matériau n'a été détectée.



**Figure 18.4.** Diffractogramme de l'échantillon 1000°C-10°C/min-10 min

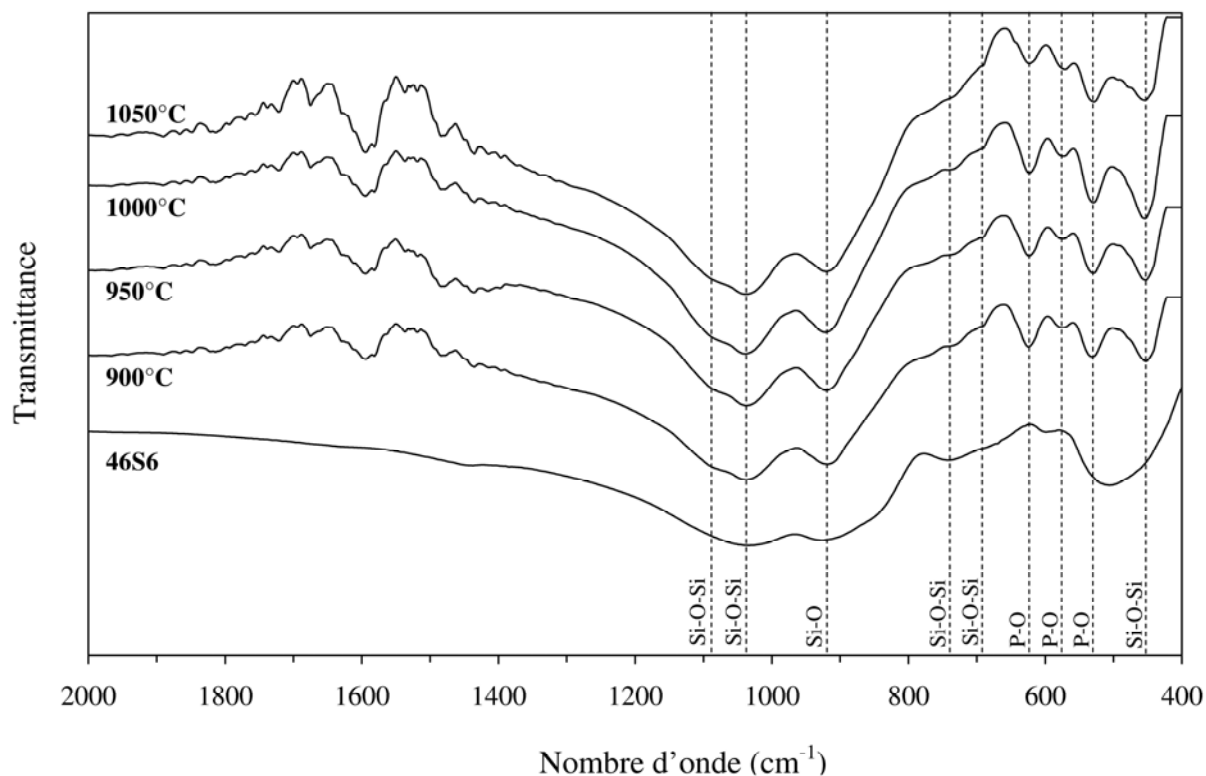
## 2.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge du verre bioactif 46S6 et des phosphosilicates poreux synthétisés à des températures comprises entre 900 et 1050°C (palier de réaction de 10 min) sont présentés sur la figure 18.5.

De la même manière que pour les phosphosilicates synthétisé à partir de nitrure d'aluminium, les principales bandes d'absorption du 46S6Zn sont observées à 1038, 920 et 506  $\text{cm}^{-1}$ . Elles sont attribuées aux vibrations d'élongation Si-O-Si et Si-O et aux vibrations de déformation angulaire Si-O-Si, respectivement. Deux épaulements sont observés à 745 et 690  $\text{cm}^{-1}$ ; ils sont attribués aux vibrations d'élongation Si-O-Si. Après traitement thermique, la bande large à 1038  $\text{cm}^{-1}$  s'est scindée en deux bandes grâce à la combinaison de tétraèdres de silicium isolés [151]. Dans le même temps, la bande à 920  $\text{cm}^{-1}$ , attribuée aux liaisons Si-O, augmente en intensité. Cette augmentation est provoquée par la cristallisation de la phase majoritaire  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  [153]. La présence d'un phosphate de calcium cristallin est confirmée par les nouvelles bandes observées à 623, 574 et 529  $\text{cm}^{-1}$ .



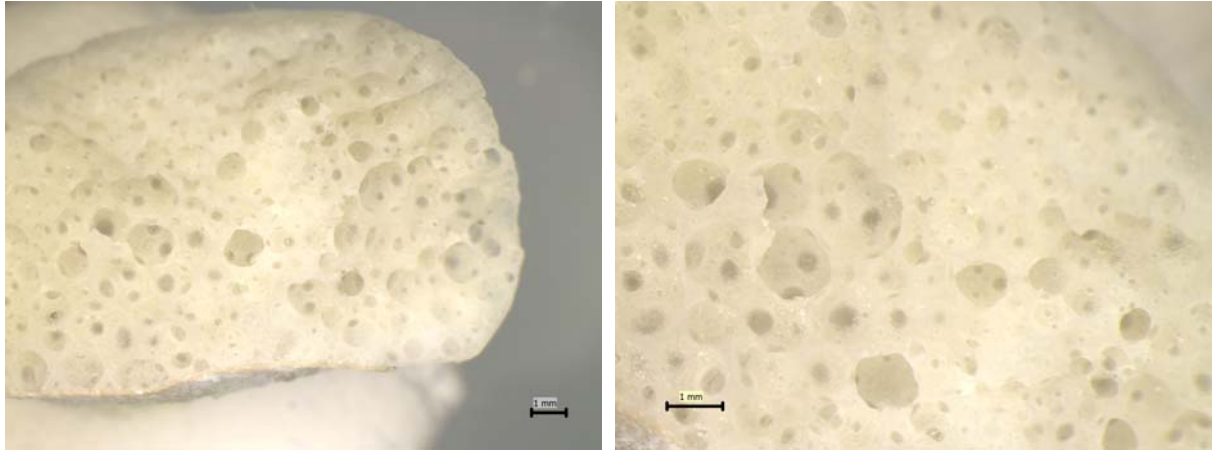
En effet, les bandes à 623 et 574  $\text{cm}^{-1}$  sont caractéristiques des liaisons P-O en phase cristalline, ce qui est en accord avec l'identification de la phase  $\text{NaCaPO}_4$  par diffraction des rayons X. La bande à 529  $\text{cm}^{-1}$  est quant à elle liée aux phosphates en phase amorphe.



**Figure 18.5.** Spectres IR du 46S6 et des phosphosilicates poreux pour différentes températures de réaction

### 2.3. Observation du matériau et évaluation de la taille des pores

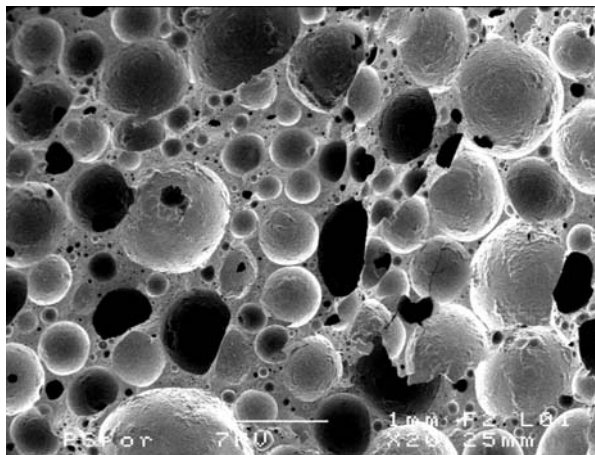
La figure 18.6 présente les photographies au microscope optique des phosphosilicates poreux synthétisés selon les conditions suivantes : température de palier de 1000°C, rampe de 10°C/min et temps de palier de 10 min. L'échelle est de 1 mm. L'échantillon y apparaît globalement homogène en morphologie.



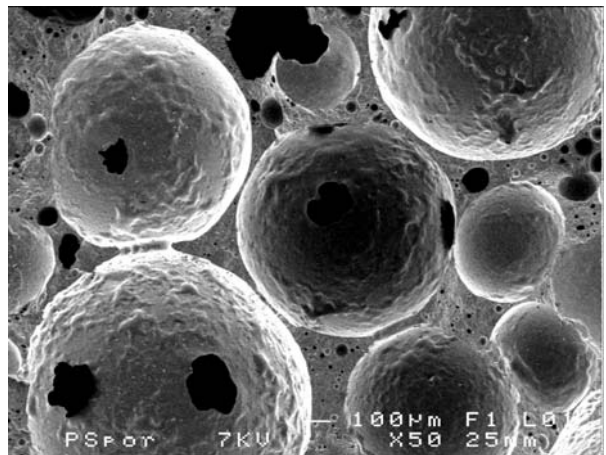
**Figure 18.6.** Observation au microscope optique du phosphosilicate 1000°C-10°C/min-10min

Le matériau synthétisé présente une morphologie proche de celle d'une mousse et apparaît comme globalement homogène. Les pores observés sont de forme sphérique, ce qui est cohérent avec un dégagement de gaz lors du traitement thermique.

Les figures 18.7 à 18.9 présentent cette fois les micrographies de la surface de ce même échantillon à grossissement croissant ( $G \times 20$ ,  $\times 50$  et  $\times 500$ ), afin de pouvoir observer les différents types de porosité et d'évaluer la taille des pores.

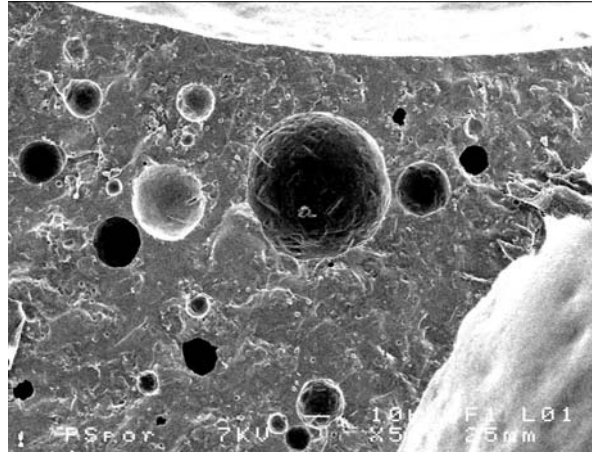


**Figure 18.7.** Morphologie de l'échantillon  
1000°C – 10°C/min – 10min ( $G \times 20$ )



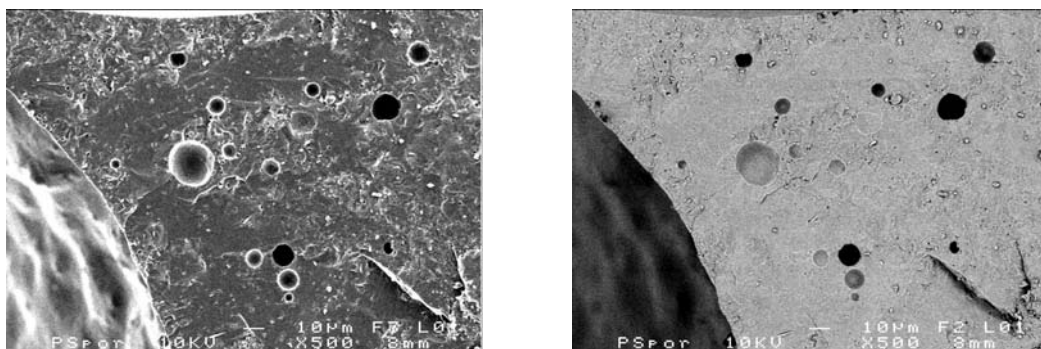
**Figure 18.8.** Morphologie de l'échantillon  
1000°C – 10°C/min – 10min ( $G \times 50$ )

L'observation au MEB confirme le fait que la porosité obtenue est interconnectée. D'après les micrographies, deux types de porosité sont observées, comprenant des macropores et des micropores.



**Figure 18.9.** Morphologie de l'échantillon 1000°C – 10°C/min – 10min (G x500)

Le diamètre moyen des macropores est compris entre 100 et 1000 µm (figures 18.7 et 18.8). Ainsi, les cellules de taille importante, comme les ostéocytes (cellules osseuses dont le rôle est de produire le tissu osseux), peuvent coloniser l'implant en pénétrant à travers les interconnexions de taille suffisante. Le diamètre moyen des micropores est inférieur ou égal 10 µm (figure 18.9). La présence de ces derniers permet l'adhésion des cellules à la surface du matériau et favorise la circulation des fluides biologiques.



**Figure 18.10.** Images en électrons secondaires (à gauche) et en électrons rétrodiffusés (à droite) d'une même surface de l'échantillon 1000°C – 10°C/min – 10min (G x500)

La figure 18.10 présente deux images de la même surface de l'échantillon : la première en électron secondaire et la seconde en électrons rétrodiffusés, afin de nous assurer de l'homogénéité en composition de notre matériau. L'échantillon apparaît être homogène en composition. En effet, l'image obtenue en électrons rétrodiffusés ne présente aucun contraste en composition chimique.

### 3. Bilan de cette étude

L'objectif de cette seconde étude sur les matériaux poreux était de mettre au point un biomatériau poreux, synthétisé cette fois à partir d'un mélange verre bioactif broyé - nitrure de titane. Dans ce but, les paramètres de synthèse ont été optimisés et l'échantillon présentant les caractéristiques morphologiques recherchées s'est avéré être le matériau synthétisé à 1000°C avec une rampe de 10°C/min et un palier de réaction de 10 min.

Ce dernier a été caractérisé par différentes méthodes physico-chimiques. Ainsi, il présente une structure proche de celle du 45S5 après traitement thermique ; c'est une vitrocéramique contenant deux phases :  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  et  $\text{NaCaPO}_4$ . Aucune trace de titane sous forme de nitrure ou d'oxyde n'a été détectée par DRX. Concernant les critères morphologiques, ce phosphosilicate possède une porosité interconnectée, comprenant deux types de pores. Des macropores, d'un diamètre moyen compris entre 100 et 1000  $\mu\text{m}$ , et des micropores d'un diamètre moyen inférieur ou égal à 10  $\mu\text{m}$ , ont été observés lors de l'étude par microscopie électronique à balayage.

Le comportement de ce matériau lors de tests *in vitro* en l'absence et en présence de cellules sera évalué prochainement. L'étude de la bioactivité est le prochain axe d'étude qui sera développé. Des études mécaniques sont également envisagées afin de déterminer la résistance en compression du phosphosilicate poreux.



## **Chapitre 19**

### **Revêtements d'alliages de titane en verre bioactif**

Ce chapitre a pour but de présenter une application des verres bioactifs. L'intérêt des revêtements en verre bioactif est de servir trois objectifs : améliorer l'ostéointégration des implants métalliques, protéger le métal contre la corrosion des fluides biologiques et protéger les tissus des produits de corrosion des alliages [155]. L'objectif de cette étude consiste donc à évaluer le comportement des verres bioactifs en tant que matériaux de revêtements des prothèses métalliques à base d'alliages de titane.

#### **1. Le revêtement par dip-coating**

##### **1.1. Choix de la méthode de revêtement**

La technique habituelle par projection plasma pour le revêtement d'alliages de titane en verre bioactif possède certains inconvénients. En effet, les revêtements obtenus ne présentent pas une bonne tenue mécanique et les propriétés des verres bioactifs ne sont pas conservées lors de la projection plasma [155].

Une méthode alternative de revêtement est le dip-coating, suivi d'un frittage. Ce procédé offre l'avantage de préserver intacte la composition initiale du verre utilisé, contrairement à la technique de projection plasma utilisée actuellement. De plus, il présente une certaine facilité de mise en œuvre et un coût limité. Cette méthode a donc été retenue pour réaliser les premiers essais de revêtements d'alliages de titane en verre bioactif.

Cette étude a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe Chimie-Métallurgie de l'UMR-CNRS 6226 Sciences Chimiques de Rennes, chargée d'élaborer les substrats en alliages de titane pour le revêtement.

## 1.2. Critères d'utilisation de cette méthode

Plusieurs critères sont nécessaires à la mise en oeuvre de cette méthode de revêtement [155]:

1. le cycle de frittage ne doit pas dégrader les propriétés du métal ou du verre,
2. le coefficient d'expansion thermique du verre doit être proche de celui du métal afin d'éviter la création de contraintes qui provoquent des fissures ou des délaminations du revêtement durant le procédé de fabrication,
3. le cycle de frittage doit permettre une adhésion optimale à l'interface.

Afin de satisfaire à ces critères, les températures de frittage doivent se situer en dessous de la transformation  $\alpha \rightarrow \beta$  des alliages de titane (entre 885 et 950°C pour le Ti pur en fonction de la teneur en impuretés et entre 955 et 1010°C pour le Ti6Al4V). Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 2, les verres bioactifs sont typiquement des verres de silice avec une teneur en SiO<sub>2</sub> inférieure à 60 % en masse. Le coefficient d'expansion thermique des verres bioactifs est généralement plus élevé que celui des alliages à base de titane. Une méthode simple pour réduire ce coefficient est d'augmenter la teneur en SiO<sub>2</sub> du verre ; mais cela implique également une réduction de la bioactivité. Il s'agit donc de trouver un compromis dans la composition à utiliser.

Plusieurs compositions de verre bioactif ont été développées pour répondre à ces critères. Elles sont issues du système SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-K<sub>2</sub>O-CaO-MgO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et ont été appliquées sur des alliages de Ti6Al4V en montrant une bonne tenue mécanique [155-158].

Le but de ce travail consiste à étudier les propriétés d'une nouvelle famille d'alliage à base de titane et de nouvelles compositions de verre afin d'améliorer l'adhésion du revêtement au substrat métallique, par la création de liaisons chimiques fortes à l'interface.

## 2. Protocole expérimental

Dans un premier temps, nous avons choisi faire les essais préliminaires avec la composition de verre 6P57 appartenant au système  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-CaO-MgO-P}_2\text{O}_5$ . Cette composition, utilisée dans la littérature et présentant les propriétés recherchées, servira de référence pour notre étude de revêtement sur les nouvelles familles d'alliages à base de Ti-Mo. D'autres compositions seront étudiées par la suite dans le but d'améliorer l'adhésion de notre biomatériau sur ces alliages. Ces compositions devront également permettre d'améliorer la bioactivité de nos verres et ainsi optimiser la bioconsolidation os-implant.

### 2.1. Synthèse et préparation des verres

Le verre de référence 6P57 est noté dans ce travail sous la forme 57S6, afin de disposer d'une nomenclature cohérente avec celle utilisée précédemment ; sa composition est présentée dans le tableau 19.1. Pour sa synthèse, les quantités appropriées de dioxyde de silicium et de magnésium, de carbonate de sodium, de calcium et de potassium et de phosphate de sodium sont pesées selon les proportions suivantes :

- $\text{SiO}_2$  : 56,5 %
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  : 14,33 %
- $\text{NaPO}_3$  : 8,63 %
- $\text{CaCO}_3$  : 26,72 %
- $\text{MgO}$  : 8,5 %
- $\text{K}_2\text{CO}_3$  : 4,39 %

	$\text{SiO}_2$	$\text{Na}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{O}$	$\text{CaO}$	$\text{MgO}$	$\text{P}_2\text{O}_5$
57S6	56,5	11	3	15	8,5	6

**Tableau 19.1.** Compositions en oxyde du verre 57S6 (% massique)

Les poudres sont ensuite placées pendant 45 min dans un mélangeur tridimensionnel. Cette étape garantit un mélange homogène de nos produits de départ, sans ségrégation entre les composants.



La fusion des poudres s'effectue par calcination à 1400°C pendant 4h dans un creuset en platine afin d'éviter toute pollution. L'étape de fusion à 1400°C est précédée d'un palier de décarbonation à 900°C pendant 2h30. Le mélange réactionnel fondu est enfin coulé dans des moules en laiton préchauffés à 500°C et les verres ainsi synthétisés sont recuits pendant environ 6h à la température de transition vitreuse afin d'évacuer les contraintes mécaniques résiduelles. A l'issue du recuit, les verres sont refroidis jusqu'à la température ambiante selon une rampe de 1°C.min<sup>-1</sup>.

Le verre synthétisé est ensuite broyé jusqu'à obtention d'une poudre fine (granulométrie inférieure à 40 µm) et homogène, pour pouvoir être déposé sur les substrats métalliques. Le broyage est réalisé à l'aide d'un broyeur planétaire (Retsch, PM 100). Le temps de broyage est fixé à 10 min pour 100g de verre, à une vitesse de rotation de 600 rpm.

## 2.2. Préparation des alliages de titane

Nous avons choisi de réaliser les essais de dépôt préliminaires sur les alliages de référence T40 (titane pur) et Ti6Al4V. Les échantillons de titane pur se présentent sous la forme de disque de 20 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur et les disques de Ti6Al4V ont un diamètre de 13 mm et une épaisseur de 3 mm.

L'étape suivante est d'effectuer la même étude de dépôt de revêtement en verre bioactif, mais cette fois sur une nouvelle famille d'alliages Ti-Mo. Cependant, la synthèse de ces nouveaux alliages est rendue difficile par le fait que l'élément d'addition utilisé (le molybdène Mo) a une température de fusion très élevée. De plus, le titane, très réactif avec son environnement, nécessite des moyens technologiques d'élaborations sous atmosphère contrôlée. Pour ce faire, l'équipe Chimie-Métallurgie dispose de diverses techniques expérimentales de mises en œuvre comme la fusion au four à arc sous atmosphère contrôlée, les traitements thermiques de trempes ou de recuits, sous vide poussé ou sous atmosphère neutre, ou encore la fusion en creuset sectorisé en lévitation magnétique. Ce dernier type de fusion évite le contact entre l'alliage et le creuset. Il s'agit donc d'une technique unique qui permet une élaboration dans des conditions ultra propres (pas de réaction avec le creuset), ce qui est idéal pour la synthèse d'alliages biocompatibles à haut point de fusion.

Deux familles d'alliages ont été synthétisées dans le cadre de cette étude ; il s'agit de Ti12Mo et Ti5Ta12Mo.

L'ensemble des échantillons d'alliages de titane fourni ont été polis à la pate diamant (1  $\mu\text{m}$ ) et présentent ainsi une face avec un polissage miroir. De cette manière, l'état de surface est identique pour tous les substrats métalliques.

### 2.3. Dépôt des revêtements en verres bioactifs

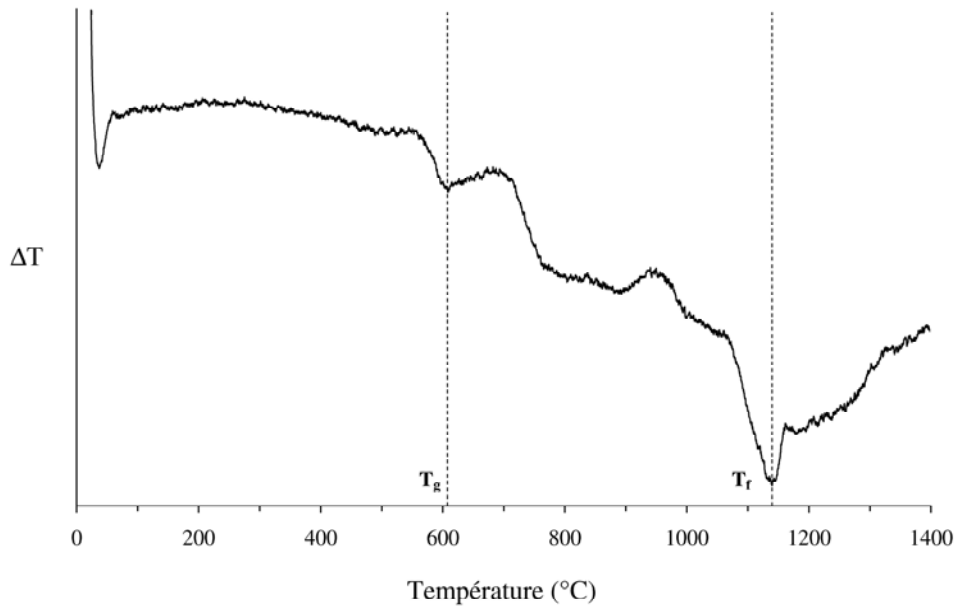
Les revêtements de verre sont déposés par dip coating sur les substrats métalliques, préalablement nettoyés à l'éthanol et l'acétone. Les suspensions sont réalisées en disposant 50 à 75 % en masse de poudre de verre dans une solution d'éthanol et la vitesse utilisée pour le dépôt sera d'environ 1000 mm/min. La suspension doit être agitée de façon continue entre les dépôts, de façon à éviter la sédimentation des poudres.

Une fois déposés, les revêtements sont séchés sous air à 75°C pendant 12h, puis frittés sous argon entre 650 et 850°C afin de permettre l'adhésion au métal. Les échantillons sont déposés dans le four, puis montés en température à 10°C/min jusqu'à la température désirée. La phase de montée en température est effectuée à pression atmosphérique et sous flux d'argon. Une fois la température maximum atteinte et le temps de frittage passé, les échantillons sont trempés à l'air. D'après la littérature, l'épaisseur du revêtement final devrait être comprise entre 25 et 150  $\mu\text{m}$  [155-158].

## 3. Résultats préliminaires à cette étude

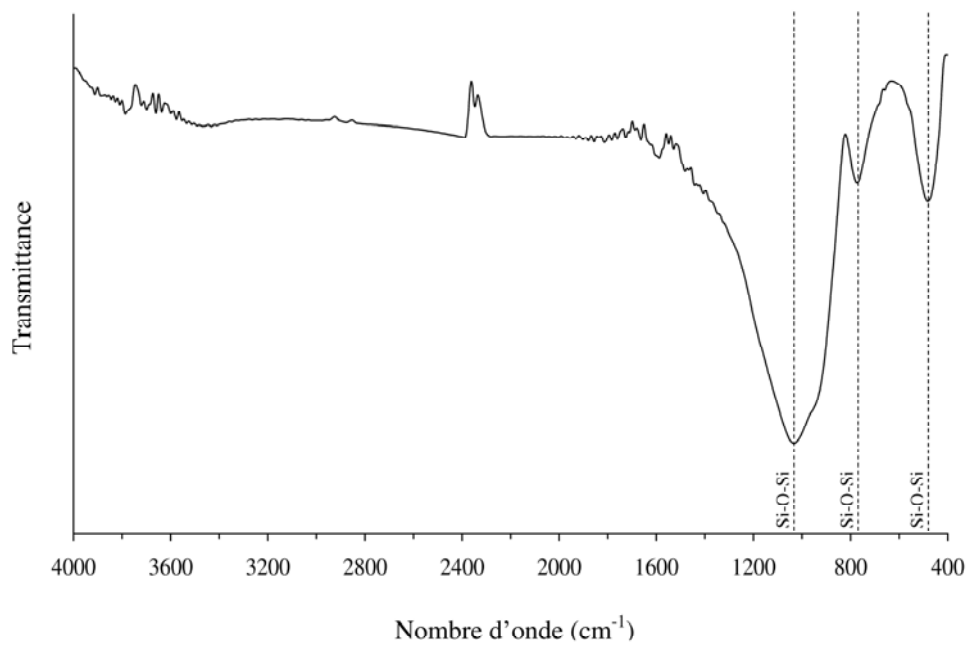
### 3.1. Caractérisation du verre 57S6

Les températures caractéristiques du verre ont été étudiées par analyse thermique et sa structure par diffraction des rayons X et spectroscopie d'absorption infra rouge. La figure 19.1 représente les courbes d'analyse thermique différentielle obtenues.



**Figure 19.1.** Analyse thermique différentielle du verre 57S6

La diffraction des rayons X confirme l'absence d'ordre à longue distance dans la matrice du 57S6. Notre matériau est bien amorphe. Le spectre d'absorption infrarouge est présenté sur la figure 19.2.



**Figure 19.2.** Spectre IR du 57S6

Trois bandes d'absorption observées sur le spectre du 57S6 sont attribuées aux vibrations d'élongation Si-O-Si et situées respectivement à 1033, 773 et 482 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2. Caractérisation des alliages de titane

Le comportement des deux nouveaux alliages de titane Ti12Mo et Ti5Ta12Mo a été étudié lors de tests *in vitro* en milieu physiologique simulé. Le milieu utilisé pour cette étude est le SBF et le protocole suivi est le même que celui présenté au Chapitre 5.

Les échantillons d'alliages de titane fourni possèdent un diamètre de 7 mm et une hauteur de 2 mm ; leur surface totale est donc de 121 mm<sup>2</sup>. Pour l'immersion des échantillons, nous avons choisi un rapport V/S, proche d'un rapport déjà utilisé lors de l'étude du relargage d'éléments lors de tests *in vitro* sur des substrats métalliques [159]. Ce rapport est fixé à :

$$\frac{V}{S} = 0,065$$

Dans notre cas, nous avons choisi d'immerger les échantillons dans un volume de 8 ml de SBF, ainsi on obtient :

$$\frac{V}{S} = 0,066$$

Une fois immergés, les échantillons ont été maintenus à 37°C et sous agitation contrôlée (50 rpm) pour des délais de 7 et 15 jours. Chaque délai d'immersion a été réalisé en duplicata. A l'issue des deux délais, les échantillons sont prélevés, rincés soigneusement à l'eau distillée, puis séchés à température ambiante. Le SBF a été également conservé et stocké au réfrigérateur afin de pouvoir être analysé par ICP-OES.

### 3.3. Premiers revêtements

La mise au point des revêtements s'avère être longue et difficile. La première difficulté rencontrée porte sur la granulométrie des poudres de verres. En effet, même après un broyage efficace, cette dernière est encore trop élevée pour pouvoir se déposer de façon homogène à la surface des substrats métalliques.

Il faut donc tout d'abord commencer par diminuer la granulométrie des poudres. Dans cette optique, une étude de l'évolution de la granulométrie des poudres en fonction du temps de broyage est à envisager. Le but de cette étude est d'obtenir une granulométrie des poudres contrôlée, car la méthode classique de tamisage devient difficile d'utilisation pour une granulométrie inférieure à 40  $\mu\text{m}$ .

Ainsi, une granulométrie fine permettra de réaliser des suspensions colloïdales qui sédimenteront moins et le dépôt réalisé sera alors plus homogène.

# CONCLUSION GENERALE



## Conclusion générale

Le défi actuel consiste à développer de nouveaux biomatériaux, capables de se lier aux tissus osseux et aptes à stimuler les interactions cellules – implant, pour favoriser la régénération cellulaire. L'enjeu est une amélioration significative de la bioconsolidation et de la repousse osseuse, afin d'aider à la guérison des patients. De tels biomatériaux trouvent de nombreuses applications en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Le développement de ces nouveaux matériaux nécessite une approche pluridisciplinaire et conduit donc à des collaborations étroites entre chirurgiens, chimistes, physiciens et biologistes.

Dans notre équipe de recherche, nous avons étudié des verres du système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  synthétisés par fusion à haute température. Trois éléments dopants, le magnésium, le zinc et le strontium, ont été introduits, séparément puis simultanément, dans la matrice vitreuse. Les différents verres élaborés ont présenté une structure amorphe et homogène. Les études RMN réalisées sur ces matériaux montrent que les siliciums sont présents dans deux types d'environnement tétraédrique, qui sont les espèces  $\text{Q}^2$  et  $\text{Q}^3$ . L'ensemble des phosphores sont dans un environnement orthophosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ . Seul le verre dopé au magnésium présente une structure différente de celle du verre pur 46S6.

Le comportement des différents verres a ensuite été évalué lors de tests *in vitro* en milieu physiologique simulé pour différents délais d'immersion, en l'absence puis en présence de cellules. L'influence des éléments dopants introduits sur la réactivité chimique des verres et sur le processus de bioactivité a ainsi pu être étudiée. Les résultats obtenus ont montré que la bioactivité de nos verres était avérée par la formation d'une couche de phosphate de calcium à leur surface et ce, quelle que soit la composition synthétisée. Cependant, si les réactions physico-chimiques du mécanisme de bioactivité sont communes à tous les verres, l'introduction d'éléments dopants influe fortement sur la cinétique de dissolution de la matrice vitreuse. La couche d'hydroxyapatite développée en surface est également modifiée, aussi bien du point de vue de sa cinétique de formation, que de sa cristallisation (forme et taille des cristaux). Ainsi, une plus grande solubilité de la matrice vitreuse et la non-cristallisation de l'hydroxyapatite en surface peuvent être corrélées à la présence de magnésium dans la matrice vitreuse. La présence de zinc ou de strontium



engendrent quant à elles une meilleure stabilité chimique de la matrice et induisent un ralentissement de la formation de la couche riche en  $\text{SiO}_2$ . Concernant la cristallisation de la couche d'hydroxyapatite, l'introduction de zinc entraîne une diminution de la taille des cristaux et différents effets sont observés selon la teneur en strontium introduite. Enfin, la présence des trois dopants simultanément augmente la cinétique de formation et de cristallisation de la couche d'hydroxyapatite, dans le cas du 46S6 Os. L'hydroxyapatite formée présente également une meilleure qualité de cristallisation. En ce qui concerne le 46S6 Sup, ce dernier présente un comportement très proche du 46S6Mg120, corrélé à la teneur de magnésium identique pour ces deux compositions, mais également modéré par présence de zinc et de strontium.

Ces observations nous ont amené à approfondir notre compréhension des phénomènes observés par le biais d'une étude structurale des verres après immersion. Cette étude, réalisée sur poudres par RMN du solide, a constitué une approche originale de l'étude de la bioactivité des verres. Nous avons ainsi mis en évidence la formation de deux nouvelles espèces de tétraèdres  $\text{SiO}_4$  ( $\text{Q}^3(\text{OH})$  et  $\text{Q}^4$ ) dans le réseau vitreux, qui témoignent de la dissolution de ce dernier et de la formation d'une couche riche en  $\text{SiO}_2$ . De plus, nous avons constaté l'apparition d'une nouvelle composante, notée  $\text{PO}_4^{3-}(\text{HA})$  sur les spectres en RMN  $^{31}\text{P}$ , caractéristique de la formation progressive d'une couche d'hydroxyapatite à la surface des verres, lors des tests *in vitro*. Cette étude a également montré d'importantes différences de réactivité chimique entre les échantillons sous forme massive et sous forme de poudre. Ainsi, sur les poudres, l'introduction de strontium dans la matrice vitreuse augmente la réactivité chimique du verre et la cinétique de formation de l'hydroxyapatite.

Les études *in vitro* en milieu physiologique simulé ont été complétées par des études *in vitro* en milieu cellulaire. Ces dernières ont mis en évidence la non-cytotoxicité, ainsi qu'une bonne prolifération cellulaire à la surface de nos différents matériaux.

Nous avons enfin élaboré deux types de matériaux poreux par une méthode de synthèse différente de la voie sol-gel, le but étant de fournir un substrat capable de répondre aux exigences en termes de porosité et d'être utilisé en tant que biomatériaux de comblement ou de substitution osseux. Les phosphosilicates synthétisés présentent une porosité comprenant des macropores et des micropores et les résultats concernant la bioactivité de ces matériaux sont très encourageants.

## Perspectives

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse ouvrent la voie à nombreuses possibilités d'investigation sur les verres bioactifs, aussi bien au niveau de la synthèse des matériaux que de leurs applications potentielles.

En premier lieu, la mise au point des paramètres de synthèse et l'évaluation du comportement des phosphosilicates poreux synthétisés à partir de nitrure de titane lors des essais *in vitro* est à compléter. La connaissance des propriétés mécaniques et de la biocompatibilité seront également nécessaire avant d'envisager de proposer ce matériau pour des applications en tant que comblement ou substitut osseux.

Dans un second temps, le développement de l'application des verres bioactifs comme revêtement de nouveaux alliages de titane est une voie à développer en collaboration avec l'équipe Chimie-Métallurgie de l'UMR-CNRS 6226 Sciences Chimiques de Rennes. De nombreuses possibilités sont envisageables pour agrandir le champ d'investigation de cette étude, telles que les revêtements déposés par voie sol-gel ou encore en nano-particules de verres bioactifs.

Enfin, l'étude *in vivo* de nos matériaux est en cours de réalisation dans le cadre d'une collaboration internationale avec la faculté St Joseph du Liban. Un nombre non négligeable de matériaux font actuellement l'objet de cette étude. Les résultats permettront d'apporter la connaissance du comportement de nos matériaux une fois implantés. En particulier, l'étude de l'interface implant – tissu osseux permettra d'évaluer la bioconsolidation et de préciser les applications possibles de ce type de biomatériaux.

Pour compléter ce travail et concernant la synthèse, l'étude de l'introduction d'autres éléments dopants est également envisageable et la combinaison des différents éléments offrent de multiples possibilités de composition. Une dernière perspective porte sur la possibilité de fonctionnaliser la surface des verres bioactifs par greffage de substances.



# REFERENCES



## Références

- [1] D. F. Williams  
*Definitions in Biomaterials*  
Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, UK, 1986
- [2] A. C. Derrien  
*Synthèse et caractérisation physico-chimique de géopolymères. Application: cinétique de minéralisation de géopolymères et du biomatériau  $\text{CaCO}_3$  synthétique*  
Thèse, n° d'ordre 3042, Université de Rennes 1, 2004
- [3] L. L. Hench  
*Bioceramics: From Concept to Clinic*  
Journal of the American Ceramic Society, 1991 (74) 1487-1510
- [4] G. Daculsi, O. Malard and E. Goyenvalle  
*Efficacité et performance des substituts osseux pour remplacer les allogreffes et autogreffes*  
ITBM-RBM, 2005 (26) 218-222
- [5] K. De Groot  
*Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties*  
In: K. De Groot, editor. Bioceramics of calcium phosphate. Boca Raton: CRC press; 1983. p 100-114
- [6] K. De Groot  
*Effect of porosity and physico-chemical properties on the stability, resorption and strength of calcium phosphate ceramics*  
In: P. Ducheyne and J. Lemons, editors. Bioceramics: Material characteristics versus *in vivo* behavior. New York: Annals of New York Academy Sciences; 1988. p 268-277
- [7] M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Posner  
*Crystal Structure of Hydroxyapatite*  
Nature, 1964 (204) 1050-1052
- [8] G. Montel, G. Bonel, J. C. Trombe, J. C. Heughebaert, C. Rey  
*Progrès dans le domaine de la chimie des composés phosphores solides à structure d'apatite. Application à la biologie et au traitement des minerais*  
Pure & Appl. Chem., 1980 (52) 973-987
- [9] I. Gutowska, Z. Machoy, B. Machalinski  
*The role of bivalent metals in hydroxyapatite structures as revealed by molecular modeling with the HyperChem software*  
Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005 (75A) 788-793
- [10] D. McConnel  
*Apatite. Its Crystal Chemistry, Mineralogy, Utilisation and Biologic Occurrences*  
1973, Springer-Verlag
- [11] G. Guillemin, J. L. Patat, J. Fournie and M. Chetail  
*The use of coral as a bone graft substitute*  
Journal of Biomedical Materials Research, 1987 (21) 557-567

- [12] G. Guillemin, A. Meunier, P. Dallant, P. Christel, J. C. Pouliquen and L. Sedel  
*Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities*  
Journal of Biomedical Materials Research, 1989 (23) 765-779
- [13] J. L. Irigaray, H. Oudadesse, G. Blondiaux and D. Collangettes  
*Kinetics of the diffusion of some elements evaluated by neutron activation in a coral implanted in vivo*  
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1993 (169) 339-346
- [14] A. C. Derrien, H. Oudadesse, S. Martin, A. Lucas-Girot, G. Cathelineau, T. Sauvage and G. Blondiaux  
*Mineralization kinetics of various implanted bioceramics*  
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2004 (226) 281-290
- [15] H. Oudadesse, A. C. Derrien, A. Lucas-Girot, S. Martin, G. Cathelineau, T. Sauvage and G. Blondiaux  
*In Vivo Mineral Composition Evolution of a Synthetic CaCO<sub>3</sub> Aragonite Used as Biomaterial for Osseous Substitution*  
Instrumentation Science and Technology, 2004 (32) 545-554
- [16] A. Lucas  
*Elaboration d'un composite macroporeux associant carbonate de calcium et antibiotique. Tolérance immunologique locale d'un biomatériau implantable : corail/collagène*  
Thèse, n° d'ordre 1511, Université de Rennes 1, 1996
- [17] A. Lucas-Girot, P. Langlois, J. C. Sangleboeuf, A. Ouammou, T. Rouxel and J. Gaudé  
*A synthetic aragonite-based bioceramic: influence of process parameters on porosity and compressive strength*  
Biomaterials, 2002 (23) 503-510
- [18] A. Lucas-Girot, M. C. Verdier, O. Tribut, J. C. Sangleboeuf, H. Allain, H. Oudadesse  
*Gentamicin-loaded calcium carbonate materials: Comparison of two drug-loading modes*  
J. Biomed. Mat. Res. Part B: Applied Biomaterials, 2005 (73B) 164-170
- [19] A. Lucas-Girot, J. Gaudé, C. Carel, J. F. Michel, G. Cathelineau  
*A synthetic aragonite-based ceramic as a bone graft substitute and substrate for antibiotics*  
International Journal of Inorganic Materials, 2001 (3) 87-94
- [20] J. Davidovits  
*Properties of geopolymers cements*  
1st International Conference on Alkaline Cements and Concretes, Kiev, 1994, 131-149
- [21] H. Oudadesse, A. C. Derrien, M. Mami, S. Martin, G. Cathelineau and L. Yahia  
*Aluminosilicates and biphasic HA-TCP composites: studies of properties for bony filling*  
Biomedical Materials, 2007 (S59)
- [22] H. Oudadesse, A. Derrien, M. Le Floch and J. Davidovits  
*MAS-NMR studies of geopolymers heat-treated for applications in biomaterials field*  
Journal of Materials Science, 2007 (42) 3092-3098

- [23] H. Oudadesse, A. C. Derrien and M. Le Floch  
*Infrared and nuclear magnetic resonance structural studies vs. thermal treatment of geopolymers/biphasic calcium phosphates*  
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2005 (82) 323-329
- [24] D. F. Williams  
*Tissue - Biomaterial interactions, a review*  
Journal of Materials Science, 1987 (22) 3421-3445
- [25] P. Exbrayat  
*La biocompatibilité des matériaux dentaires*  
Journal des Biomatériaux Dentaires, 1998 (13) 177-202
- [26] L. G. Donaruma  
*Biomaterials - an interfacial approach*  
L. L. Hench and E. C. Ethridge, Academic, London, 1982, 385 pp., Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 1983 (21) 677
- [27] W. Cao and L. L. Hench  
*Bioactive materials*  
Ceramics International, 1996 (22) 493-507
- [28] R. Coujard, J. Poirier and J. Racadot  
*Précis d'histologie humaine*  
Paris, 1980. p 210-230
- [29] D. W. Fawcett  
*A textbook of histology, 11th edition*  
Philadelphia; 1986. p 199-216
- [30] A. Spence  
*Basic medical anatomy*  
Benjamin/Cummings, 1990
- [31] M. L. Carvalho, A. F. Marques, M. T. Lima and U. Reus  
*Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence*  
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2004 (59) 1251-1257
- [32] T. Molleson  
*Trace Elements in Environmental History*  
G. Grupe and B. Hermann Editors, Springer, 1988. p 67
- [33] G. C. Cotzias  
*Importance of trace substances in environmental health as exemplified by manganese*  
Trace Substances in Environmental Health, 1967 (1) 5-19
- [34] H. Oudadesse, S. Martin, A. Derrien, A. Lucas-Girot, G. Cathelineau and G. Blondiaux  
*Determination of Ca, P, Sr and Mg in the synthetic biomaterial aragonite by NAA*  
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2004 (262) 479-483
- [35] T. Okuma  
*Magnesium and bone strength*  
Nutrition, 2001 (17) 679-680



- [36] A. Hartwig  
*Role of magnesium in genomic stability*  
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001 (475) 113-121
- [37] H. Zreiqat, C. R. Howlett, A. Zannettino, P. Evans, G. Schulze-Tanzil, C. Knabe and M. Shakibaei  
*Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants*  
Journal of Biomedical Materials Research, 2002 (62) 175-184
- [38] Y. Yamasaki, Y. Yoshida, M. Okazaki, A. Shimazu, T. Uchida, T. Kubo, Y. Akagawa, Y. Hamada, J. Takahashi and N. Matsuura  
*Synthesis of functionally graded  $MgCO_3$  apatite accelerating osteoblast adhesion*  
Journal of Biomedical Materials Research, 2002 (62) 99-105
- [39] Y. Yamasaki, Y. Yoshida, M. Okazaki, A. Shimazu, T. Kubo, Y. Akagawa and T. Uchida  
*Action of FGMgCO<sub>3</sub>Ap-collagen composite in promoting bone formation*  
Biomaterials, 2003 (24) 4913-4920
- [40] A. Ito, H. Kawamura, M. Otsuka, M. Ikeuchi, H. Ohgushi, K. Ishikawa, K. Onuma, N. Kanzaki, Y. Sogo and N. Ichinose  
*Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation*  
Materials Science and Engineering: C, 2002 (22) 21-25
- [41] M. Yamaguchi and R. Yamaguchi  
*Action of zinc on bone metabolism in rats: Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content*  
Biochemical Pharmacology, 1986 (35) 773-777
- [42] M. Yamaguchi, K. Inamoto and Y. Suketa  
*Effect of essential trace metals on bone metabolism in weanling rats: Comparison with zinc and other metals' actions*  
Research in Experimental Medicine, 1986 (186) 337-342
- [43] M. Yamaguchi, H. Oishi and Y. Suketa  
*Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture*  
Biochemical Pharmacology, 1987 (36) 4007-4012
- [44] S. Kishi and M. Yamaguchi  
*Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures*  
Biochemical Pharmacology, 1994 (48) 1225-1230
- [45] B. S. Moonga, D. W. Dempster  
*Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast like cell formation in mouse marrow culture*  
Journal of Bone Mineralization Research, 1995 (10) 453-457
- [46] W. J. Bettger and B. L. O'Dell  
*Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells*  
The Journal of Nutritional Biochemistry, 1993 (4) 194-207

- [47] G. Ennas, A. Musinu, G. Piccaluga, A. Montenero and G. Gnappi  
*Structure and chemical durability of zinc-containing glasses*  
Journal of Non-Crystalline Solids, 1990 (125) 181-185
- [48] L. Montagne, G. Palavit and R. Delaval  
*<sup>31</sup>P NMR in (100-x)(NaPO<sub>3</sub>)-xZnO glasses*  
Journal of Non-Crystalline Solids, 1997 (215) 1-10
- [49] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka and T. Yamamuro  
*Effects of ions dissolved from bioactive glass-ceramic on surface apatite formation*  
Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1993 (4) 1-4
- [50] N. Takahashi, T. Sasaki, Y. Tsouderos and T. Suda  
*S 12911-2 Inhibits Osteoclastic Bone Resorption In Vitro*  
Journal of Bone and Mineral Research, 2003 (18) 1082-1087
- [51] P. J. Meunier, C. Roux, E. Seeman, S. Ortolani, J. E. Badurski, T. D. Spector, J. Cannata, A. Balogh, E. M Lemmel, S. Pors-Nielsen, R. Rizzoli, H. K. Genant, J. Y. Reginster  
*The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis*  
The New England journal of medicine 2004 (350) 459-468
- [52] G. M. Blake and I. Fogelman  
*Long-Term Effect of Strontium Ranelate Treatment on BMD*  
Journal of Bone and Mineral Research, 2005 (20) 1901-1404
- [53] M. Hott, P. Deloffre, Y. Tsouderos and P. J. Marie  
*S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats*  
Bone, 2003 (33) 115-123
- [54] G. Boivin, P. Deloffre, B. Perrat, G. Panczer, M. Boudeulle, Y. Mauras, P. Allain, Y. Tsouderos, P. J. Meunier  
*Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration*  
Journal of Bone and Mineral Research, 1996 (11) 1302-1311
- [55] L. L. Hench  
*The story of Bioglass®*  
Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2006 (17) 967-978
- [56] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen and T. K. Greenlee  
*Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*  
Journal of Biomedical Materials Research, 1971 (5) 117-141
- [57] L. L. Hench and J. K. West  
*Biological applications of bioactive glasses*  
Life Chem Rep, 1996 (13) 187-241
- [58] L. L. Hench  
*Bioactive ceramics: Theory and clinical applications*  
In: O. H. Andersson, editor. Bioceramics. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1994. p 3-14
- [59] J. Zarzycki  
*Les verres et l'état vitreux*  
Masson, 1982

- [60] M. Vallet-Regí  
*Ceramics for medical applications*  
J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2001 (2) 97-108
- [61] M. Vallet-Regí, C. Victoria-Ragel and A. J. Salinas  
*Glasses with Medical Applications*  
European Journal of Inorganic Chemistry, 2003 (2003) 1029-1042
- [62] R. Li, A. E. Clark and L. L. Hench  
*An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing*  
Journal of Applied Biomaterials, 1991 (2) 231-239
- [63] M. Vallet-Regí  
*Revisiting ceramics for medical applications*  
Dalton Transactions, 2006, 5211-5220
- [64] M. Mami, A. Lucas-Girot, H. Oudadesse, F. Mezahi, R. Dorbez-Sridi, E. Dietrich  
*Investigation of the surface reactivity of a sol-gel derived glass in the ternary system  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$*   
Applied Surface Science, 2008, doi: 10.1016/j.apsusc.2008.05.340
- [65] D. C. Greenspan and L. L. Hench  
*Chemical and mechanical behavior of bioglass-coated alumina*  
Journal of Biomedical Materials Research, 1976 (10) 503-509
- [66] L. L. Hench  
*Life and death: the ultimate phase transformation*  
Thermochimica Acta, 1996 (280-281) 1-13
- [67] L. L. Hench  
*Bioactive materials: The potential for tissue regeneration*  
Journal of Biomedical Materials Research, 1998 (41) 511-518
- [68] L. L. Hench  
*Biomaterials: a forecast for the future*  
Biomaterials, 1998 (19) 1419-1423
- [69] P. E. Keeting, M. J. Oursler, K. E. Wiegand, S. K. Bonde, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs  
*Zeolite A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro*  
Journal of Bone and Mineral Research, 1992 (7) 1281-1289
- [70] P. Claudy  
*Analyse calorimétrique différentielle : théorie et applications de la DSC*  
Lavoisier, Paris, 2005
- [71] R.F. Speyer  
*Thermal analysis of materials*  
Lavoisier, Paris, 1993
- [72] W. Wendlandt  
*Thermal methods of analysis*  
3<sup>rd</sup> ed., Wiley, New York, 1986
- [73] H.P. Klug, L.E. Alexander  
*X-Ray diffraction procedures*  
2<sup>de</sup> édition, Wiley and Sons, New York, 1974

- [74] B.D. Cullity  
*Elements of X-ray Diffraction*  
3<sup>ème</sup> édition, Addison-Wesley, New York, 1967
- [75] R. Jenkins, R.L. Snyder  
*Introduction to X-ray Powder Diffractometry*  
Wiley and Sons, New York, 1996
- [76] H.H. Willard, L.L. Merritt Jr., J.A. Dean, F.A. Settle Jr.  
*Instrumental Methods of Analysis*  
Wadworth Publishing Co., New York, 1981, 198-200
- [77] R. J. Bell  
*Introductory Fourier transform spectroscopy*  
Academic, New York, 1972
- [78] P. R. Griffiths, J. A. De Haseth  
*Chemical infrared Fourier transform spectroscopy*  
Wiley, New York, 1986
- [79] C.W. Oatley  
*The early history of the scanning electron microscope*  
J. Appl. Phys. 1982 (2) 53
- [80] J. Goldstein *et al.*  
*Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*  
Springer, 3rd edition, 1992
- [81] C. Trassy, J.M. Mermet  
*Les applications analytiques des plasmas HF*  
Lavoisier, Paris, 1984
- [82] A. Montaser, D.W. Golightly, eds.  
*Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*  
VCH Publishers, Inc., New York, 1992
- [83] R. Barnes  
*Emission spectroscopy*  
Halsted, New York, 1976
- [84] M. Mehring  
*Principles of High Resolution NMR in Solids*  
Springer Verlag, Berlin, 1983
- [85] B. Bureau  
*Caractérisation de l'ordre local dans les verres fluorés de métaux de transition par résonance magnétique nucléaire*  
Thèse, Université du Maine, 1998
- [86] D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. Le Calvé, B. Alonso, J-O. Durand, B. Bujoli, Z. Gan, G. Hoatson  
*Modelling one- and two-dimensional Solid State NMR spectra*  
Magnetic Resonance in Chemistry, 2002 (40) 70-76
- [87] I. Lebecq  
*Etude de bioverres à base de SiO<sub>2</sub>, CaO, Na<sub>2</sub>O non dopés et dopés par le phosphore*  
Thèse, Université de Valenciennes, 2002

- [88] M. Sitarz, W. Mozgawa, M. Handke  
*Rings in the structure of silicate glasses*  
Journal of Molecular Structure, 511 (1999) 282-285
- [89] M. Handke, M. Sitarz, M. Rokita, E. Galuskin  
*Vibrational spectra of phosphate-silicate biomaterials*  
Journal of Molecular Structure, 651-653 (2003) 39-54
- [90] S. A. MacDonald, C. R. Schardt, D. J. Masiello, J. H. Simmons  
*Dispersion analysis of FTIR reflection measurements in silicate glasses*  
Journal of Non-Crystalline Solids, 275 (2000) 75-82
- [91] J. Hlavac, D. Rohanova, A. Helebrant  
*The effect of tris-buffer on the leaching behaviour of bioactive glass-ceramics*  
Ceram-Silikáty, 1994 (38) 119-122
- [92] S. Falaize, S. Radin, P. Ducheyne  
*In vitro behaviour of silica-based xerogels intended as controlled release carriers*  
Journal of the American Ceramic Society, 1999 (82) 969-976
- [93] D. C. Greenspan, J. P. Zhong  
*The effect of cristallisation on the degradability of sol-gel bioactive glasses*  
Transactions of 25<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Biomaterials, vol. XXII, 1999, p.346
- [94] I. Izquierdo-Barba, A. J. Salinas, M. Vallet-Regi  
*Effect of the continuous solution exchange on the in vitro reactivity of a CaO-SiO<sub>2</sub> sol-gel glass*  
Journal of Biomedical Materials Research, 2000 (51) 191-199
- [95] A. Ramila, M. Vallet-Regi  
*Static and dynamic in vitro study of a sol-gel glass bioactivity*  
Biomaterials, 2001 (22) 2301-2306
- [96] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro  
*Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W*  
Journal of Biomedical Materials Research, 1990 (24) 721-734
- [97] T. Kokubo, H. Takadama  
*How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity*  
Biomaterials, 2006 (27) 2907-2915
- [98] F. Z. Mezahi, H. Oudadesse, A. Harabi, A. Lucas-Girot, Y. Le Gal, H. Chaair, G. Cathelineau  
*Dissolution kinetic and structural behaviour of natural hydroxyapatite versus thermal treatment, comparison with synthetic hydroxyapatite*  
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, *in press*
- [99] Fiche JCPDF 09-432
- [100] N. Qachachi  
*Elaboration et études in vitro de biomatériaux : verres bioactifs dopés*  
Rapport de stage, M2 CSM, Rennes, 2007

- [101] M. Mami, H. Oudadesse, R. Dorbez-Sridi, E. Dietrich and J. Rocherullé  
*Analysis of in vitro reaction layers formed on 48S4 glass for applications in biomaterial field*  
Eur. Phys. J. Appl. Phys., 2007 (40) 189-196
- [102] P. Sepulveda, J. R. Jones, L. L. Hench  
*In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses*  
J. Biomed. Mat. Res., 2002 (61) 301-311
- [103] I. Rehman, L. L. Hench, W. Bonfield, R. Smith  
*Analysis of surface layers on bioactive glasses*  
Biomaterials, 1994 (15) 865-870
- [104] M. Vallet-Regi, I. Izquierdo-Barba, A. J. Salinas  
*Influence of  $P_2O_5$  on crystallinity of apatite formed in vitro on surface of bioactive glasses*  
J. Biomed. Mat. Res., 1999 (46) 560-565
- [105] J. M. Oliveira, R. N. Correia, M. H. Fernandes  
*Effects of Si speciation on the in vitro bioactivity of glasses*  
Biomaterials, 2002 (23) 371-379
- [106] Y. Ebisawa, T. Kokubo, K. Ohura, T. Yamamuro  
*Bioactivity of CaO-SiO<sub>2</sub>-Based Glasses, in vitro evaluation*  
J Mater Sci: Med, 1990 (1) 239-244
- [107] L. L. Hench, G. P. La Torre  
*Reaction kinetics of bioactive ceramics part IV: Effect of glass and solution composition*  
Bioceramics, 1992 (5) 67-74
- [108] J. Lao  
*Caractérisation par micro-faisceau d'ions des réactions physico-chimiques induites in vitro par des verres bioactifs nanostructurés élaborés par la méthode sol-gel*  
Thèse, n° d'ordre DU 1763, Université Blaise Pascal, 2007
- [109] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti, N. Roveri  
*Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization*  
J. Inorg. Biochem., 1993 (49) 69-78
- [110] V. Blanchet, J. Michel, E. Jallot, L. Wortham, S. Bouthors, D. Laurent-Maquin, G. Balossier  
*Interfacial reactions of glasses for biomedical application by scanning transmission electron microscopy and microanalysis*  
Acta Biomaterialia, 2006 (2) 349-359
- [111] E. Dietrich, H. Oudadesse, A. Lucas-Girot, M. Mami  
*In vitro bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium*  
J. Biomed. Mat. Res. Part A, 2008, doi: 10.1002/jbm.a.31901
- [112] G. Calas, L. Cormier, L. Galois, P. Jollivet  
*Structure-property relationships in multicomponent oxide glasses*  
C. R. Chimie, 2002 (5) 831-843

- [113] G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, U. Segre, M. M. Carnasciali, A. Ubaldini  
*A combined experimental and computational approach to (Na<sub>2</sub>O)<sub>1-x</sub>.CaO.(ZnO)<sub>x</sub>.2SiO<sub>2</sub> glasses characterization*  
J. Non-Cryst. Solids, 2004 (710) 345-346
- [114] L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli, U. Segre  
*Qualitative and quantitative structure-property relationships analysis of multicomponent potential bioglasses*  
J. Phys. Chem. B, 2005 (109) 4989-4998
- [115] C. Wu, Y. Ramaswamy, D. Kwit, H. Zreiqat  
*The effect of strontium incorporation into CaSiO<sub>3</sub> ceramics on their physical and biological properties*  
Biomaterials, 2007 (28) 3171-3181
- [116] E. Dietrich, H. Oudadesse  
*Study of strontium effects on melt derived bioactive glasses*  
Recent Advances in Biomaterials Research, Transworld Research Network, 2008, *in press*
- [117] I. Schrooten, G. J. Behets, W. Cabrera, S. R. Vercauteren, L. V. Lamberts, S. C. Verbeckmoes, A. R. Bervoets, G. Dams, W. G. Goodman, M. E. De Broe, P. C. D'Haese  
*Dose-dependent effects of strontium on bone of chronic renal failure rats*  
Kidney Int., 2003 (63) 927-935
- [118] S. C. Verbeckmoes, G. J. Behets, L. Oste, A. R. Bervoets, L. V. Lamberts, M. Drakopoulos, A. Somogyi, P. Cool, W. Dorriné, M. E. De Broe, P. C. D'Haese  
*Effects of strontium on the physicochemical characteristics of hydroxyapatite*  
Calcif. Tissue Int., 2004 (75) 405-415
- [119] Z. Y. Li, W. M. Lam, C. Yang, G. X. Ni, S. A. Abbah, K. M. C. Cheung, K. D. K. Luk, W. W. Lu  
*Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite*  
Biomaterials, 2007 (28) 1452-1460
- [120] J. Christoffersen, M. R. Christoffersen, N. Kolthoff, O. Bärenholdt  
*Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection*  
Bone, 1997 (20) 47-54
- [121] E. Dietrich, H. Oudadesse, A. Lucas-Girot, Y. Le Gal, S. Jeanne, G. Cathelineau  
*Effects of magnesium and zinc on the surface of doped melt derived glass for biomaterials applications*  
Appl. Surf. Science, 2008, doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.094
- [122] P. Li, Q. Yang, F. Zhang, T. Kokubo  
*The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on formation of apatite layer in vitro*  
J. Mater. Sci. Mater. Medi., 1992 (13) 452-456
- [123] G. Engelhardt, D. Michel  
*High-resolution solid state NMR of silicates and zeolites*  
Wiley, New-York, 1987

- [124] K. J. D. Machenzie, M. E. Smith  
*Multinuclear solid-state NMR of inorganic materials*  
Pergamon Materials Series, Cambridge, 2002
- [125] M. W. G. Lockyer, D. Holland, R. Dupree  
*NMR investigation of the structure of some bioactive glasses*  
J. Non-Cryst. Solids, 1995 (188) 207-219
- [126] I. Elgayar, A. E. Aliev, A. R. Boccaccini, R. G. Hill  
*Structural analysis of bioactive glasses*  
J. Non-Cryst. Solids, 2005 (351) 173-183
- [127] A. Angelopoulou, V. Montouillout, D. Massiot, G. Kordas  
*Study of the alkaline environment in mixed alkali compositions by multiple-quantum magic angle nuclear magnetic resonance (MQ-MAS NMR)*  
J. Non-Cryst. Solids, 2008 (354) 333-340
- [128] M. D. O'Donnell, S. J. Watts, R. V. Law, R. G. Hill  
*Effect of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content in two series of soda lime phosphosilicate glasses on structure and properties – Part I : NMR*  
J. Non-Cryst. Solids, 354 (2008) 3554-3560
- [129] R. G. Hill  
*An alternative view of the degradation of bioglass*  
J. Mater. Sci. Lett., 15 (1996) 1122-1125
- [130] H. Grussaute, L. Montagne, G. Palavit, J. L. Bernard  
*Phosphate speciation in Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>O-TiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> glasses*  
J. Non-Cryst. Solids, 2000 (263&264) 312-317
- [131] J. M. Oliveira, R. N. Correia, M. H. Fernandes, J. Rocha  
*Influence of the CaO/MgO ratio on the structure of phase-separated glasses: a solid-state <sup>29</sup>Si and <sup>31</sup>P MAS NMR study*  
J. Non-Cryst. Solids, 2000 (265) 221-229
- [132] P. Hartmann, J. Vogel, B. Schnabel  
*NMR study of phosphate glasses and glass ceramic structures*  
J. Non-Cryst. Solids, 1994 (176) 157-163
- [133] B. C. Bunker, D. R. Tallant, T. J. Headley, G. L. Turner, R. J. Kirkpatrick  
*The structure of leached sodium borosilicate glass*  
Phys. Chem. Glasses, 1988 (29) 109-120
- [134] F. Angeli, M. Gaillard, P. Jollivet, T. Charpentier  
*Influence of glass composition and alteration solution on leached silicate glass structure: A solid-state NMR investigation*  
Geochem. et Cosmochem. Acta, 2006 (70) 2577-2590
- [135] A. Diaz, T. Lopez, J. Manjarrez, E. Basaldella, J. M. Martinez-Blanes, J. A. Odriozola  
*Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous ordered silica*  
Acta Biomater., 2006 (2) 173-179
- [136] R. Oestrike, W. H. Yang, R. J. Kirkpatrick, R. L. Hervig, A. Navrotsky, B. Montez  
*High resolution <sup>23</sup>Na, <sup>27</sup>Al and <sup>29</sup>Si NMR spectroscopy of framework aluminosilicate glasses*  
Geochem. et Cosmochem. Acta, 1987 (51) 2199



- [137] Evaluation biologique des dispositifs médicaux  
*Partie 1: Lignes directrices pour le choix des essais*  
Norme AFNOR, NF EN 10993-1:1994
- [138] Evaluation biologique des dispositifs médicaux  
*Partie 12: Préparation des échantillons et matériaux de référence*  
Norme AFNOR, NF EN 10993-12:1997
- [139] Evaluation biologique des dispositifs médicaux  
*Partie 14: Identification et quantification des produits de dégradation des céramiques*  
Norme AFNOR, NF EN 30993-14:2001
- [140] I. Christodoulou, L. D. Buttery, P. Saravanapavan, G. Tai, L. L. Hench, J. M. Polak  
*Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression*  
J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater., 2005 (74) 529-537
- [141] V. V. Välimäki, H. T. Aro  
*Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute*  
Scand. J. Surg., 2006 (95) 95-102
- [142] A. Rolland  
*Les verres azotés comme milieu réactionnel. Préparation et caractérisation de composites verre-métal et de matériaux expansés*  
Thèse, n° d'ordre 226, Université de Rennes 1, 1988
- [143] M. Tasserie  
*Optimisation physico-chimique d'un matériau expansé*  
Thèse, n° d'ordre 606, Université de Rennes 1, 1991
- [144] G. Berthon  
*Chemical speciation studies in relation to aluminium metabolism and toxicity*  
Coordination Chemistry Reviews, 1996 (149) 241-280
- [145] R. Adell, U. Lekholm, B. Rockler, P.I. Branemark  
*A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw*  
Int. J. Oral Surg., 1981 (10) 387-416
- [146] D. Van Steenberghe  
*A retrospective multicenter evaluation of the survival rate of osseointegrated fixtures supporting fixed partial prostheses in the treatment of partial edentulism*  
J. Prosthet. Dent., 1989 (61) 217-223
- [147] O. P. Filho, G. P. La Torre, L. L. Hench  
*Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5*  
J. Biomed. Mat. Res., 1996 (30) 509-514
- [148] D. C. Clupper, L. L. Hench  
*Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5*  
J. Non-Cryst. Sol., 2003 (318) 43-48
- [149] A. S. Rizkalla, D. W. Jones, D. B. Clark, G. C. Hall  
*Non-isothermal sintering with concurrent crystallization of polydispersed soda-lime-silica glass beads*  
J. Biomed. Mater. Res., 1996 (32) 119-124

- 
- [150] C. C. Lin, L. C. Huang, P. Shen  
*Na<sub>2</sub>CaSi<sub>2</sub>O<sub>6</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> based bioactive glasses. Part 1: Elasticity and structure*  
J. Non-Cryst. Sol., 2005 (351) 3195-3203
- [151] L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, A. Govin  
*Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments*  
Acta Materiala, 2007 (55) 3305-3313
- [152] L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier, R. Zenati, D. Bernache-Assolant  
*Sintering behaviour of 45S5 bioactive glass*  
Acta Biomateriala, 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.05.019
- [153] J. M. Gomez-Vega, E. Saiz, A. P. Tomsia, G. W. Marshall, S. J. Marshall  
*Bioactive glass coatings with hydroxyapatite and Bioglass<sup>®</sup> particles on Ti-based implants. 1. Processing*  
Biomaterials, 2000 (21) 105-111
- [154] M. D. O'Donnell, S. J. Watts, R. V. Law, R. G. Hill  
*Effect of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content in two series of soda lime phosphosilicate glasses on structure and properties – Part II : Physical properties*  
J. Non-Cryst. Solids, 354 (2008) 3561-3566
- [155] S. Lopez-Esteban, E. Saiz, S. Fujino, T. Oku, K. Suganuma, A. P. Tomsia  
*Bioactive glass coatings for orthopaedic metallic implants*  
J. Eur. Ceram. Soc., 23 (2003) 2921-2930
- [156] A. Pazo, E. Saiz, A. P. Tomsia  
*Silicate glass coatings on Ti-based implants*  
Acta Mater., 46 (1998) 2551-2558
- [157] D. R. Bloyer, J. M. Gomez-Vega, E. Saiz, J. M. Mcnaney, R. M. Cannon, A. P. Tomsia  
*Fabrication and characterization of a bioactive glass coating on titanium implant alloys*  
Acta Mater., 47 (1999) 4221-4224
- [158] S. Foppiano, S. J. Marshall, E. Saiz, A. P. Tomsia, G. W. Marshall  
*Functionally graded bioactive coatings: reproductibility and stability of the coating under cell culture conditions*  
Acta Biomater., 2 (2006) 133-142
- [159] Y. Okazaki, E. Gotoh  
*Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro*  
Biomaterials, 26 (2005) 11-21



# ANNEXES



## Annexe 1 : Théorie élémentaire de la spectroscopie d'absorption IR

Le rayonnement infrarouge, de nombre d'onde supérieur à  $100\text{ cm}^{-1}$ , peut être absorbé par les molécules, excitant ainsi les niveaux vibrationnelles des liaisons intra moléculaires. Dans les molécules, les liaisons vibrent à une fréquence bien déterminée, qui dépend des atomes de la liaison mais aussi de l'environnement de la liaison<sup>1</sup>.

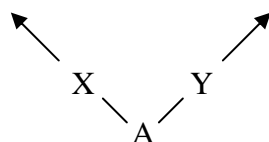
Ainsi, pour une fréquence donnée, ces liaisons rentrent en résonance ; les molécules absorbent le rayonnement infrarouge et la transmission diminue. Si on représente sur un graphe l'évolution de la transmission en fonction du nombre d'onde (la fréquence divisée par la vitesse de la lumière dans le milieu), on observe alors des bandes d'absorption, caractéristiques d'un certain type de liaison.

Différents modes de vibrations sont identifiables dans un spectre infrarouge ; on distingue notamment les vibrations d'élongation généralement intenses, et les vibrations de déformation (bending mode), où l'on distingue les déformations dans le plan et hors du plan.

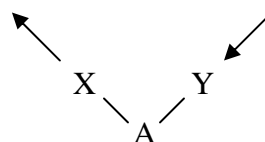
### Vibrations d'allongement ou d'élongation (stretching mode)

Pour un système à trois atomes non alignés (X, A, Y), on a 2 modes de vibrations d'allongement : une vibration symétrique et une antisymétrique. Il existera une fréquence pour chacun de ces deux modes.

Vibration symétrique  $\nu_s$



Vibration asymétrique  $\nu_{as}$



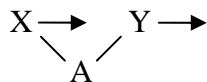
<sup>1</sup> P. R. Griffiths, J. A. De Haseth, *Chemical infrared Fourier transform spectroscopy*, Wiley, New York, 1986

### Vibrations de déformation (bending mode)

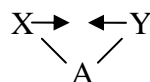
On distingue les déformations dans le plan (modification de l'angle de liaison) et les déformations hors du plan.

#### Vibrations dans le plan

Rotation  $\beta$  (rocking)

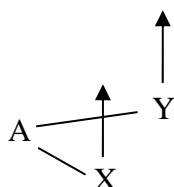


Cisaillement  $\delta$  (scissoring)

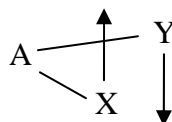


#### Vibrations hors du plan

Balancement  $\omega$  (wagging)



Torsion  $\tau$  (twisting)



Les vibrations de déformation nécessitent moins d'énergie que les vibrations d'élongation. De ce fait, on trouve les vibrations de déformations pour un nombre d'onde compris entre  $400$  et  $1500\text{ cm}^{-1}$ , tandis que les vibrations d'élongations se trouvent entre  $1500$  et  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

## **Annexe 2 : Rayonnements émis par les atomes sous un faisceau d'électrons <sup>1</sup>**

### **Les électrons secondaires**

Les électrons secondaires sont créés par le passage d'un électron incident près d'un atome. L'électron incident peut transmettre une partie de son énergie à un électron peu lié de la bande de conduction provoquant ainsi une ionisation par éjection de ce dernier électron. On appelle électron secondaire cet électron éjecté, qui possède généralement une faible énergie (pas plus de 50 eV).

Ainsi, seuls les électrons secondaires émis à une profondeur inférieure à 10 nm de la surface peuvent s'échapper de l'échantillon et être recueillis par le détecteur. Étant donné qu'ils proviennent des couches superficielles, les électrons secondaires sont très sensibles aux variations de la surface de l'échantillon et la moindre variation va modifier la quantité d'électrons collectés. Ces électrons permettent donc d'obtenir des renseignements sur la topographie de l'échantillon.

### **Les électrons rétro-diffusés**

Les électrons rétro-diffusés résultent des collisions élastiques entre un électron incident et un atome de l'échantillon. Ils sont alors dispersés dans toutes les directions avec une faible perte d'énergie. Les électrons rétro-diffusés ont une énergie relativement élevée, beaucoup plus importante que celle des électrons secondaires, allant jusqu'à 30 keV. Ils peuvent être émis à une plus grande profondeur dans l'échantillon, mais la sensibilité topographique de ce type d'électrons sera alors relativement faible, de l'ordre du micromètre ou du dixième de micromètre.

Cependant, ces électrons sont sensibles au numéro atomique des atomes constituant l'échantillon. Les atomes les plus lourds (ayant un nombre important de protons) émettront plus d'électrons rétrodiffusés que les atomes plus légers. Ainsi, les zones formées d'atomes avec un nombre atomique élevé apparaîtront plus brillante que d'autres, c'est le contraste de phase. Les images ainsi obtenues présentent alors des contrastes en composition chimique.

---

<sup>1</sup> A. Perrin, cours de magistère matériaux



### **Les photons X (ou rayons X)**

Les photons X sont émis pour permettre à un atome ionisé sous l'impact du faisceau d'électrons, de revenir à son état fondamental. Quand un électron d'une couche interne d'un atome est éjecté, un électron d'une couche plus externe comble la lacune : c'est la différence d'énergies entre ces deux couches qui provoque l'émission d'un photon X.

Les photons X possèdent une énergie caractéristique propre à chaque élément qui les a émis. Ces photons sont recueillis et classés suivant leurs énergies (EDS) ou leurs longueurs d'onde (WDS) pour donner des informations semi-quantitatives sur la composition de l'échantillon. Ils sont très pénétrants et sont émis dans une poire d'interaction de l'ordre du  $\mu\text{m}^3$ .

### **Les électrons Auger**

Un atome ionisé par un faisceau d'électrons peut également revenir à son état fondamental grâce à l'émission d'électrons Auger. Lors de la désexcitation, un électron d'une couche supérieure vient combler la lacune créée par l'électron initialement éjecté. Durant cette transition, l'électron périphérique perd une certaine quantité d'énergie qui peut être émise sous forme de photon X ou peut alors être transmise à un électron d'une orbite plus externe et donc moins énergétique. Cet électron périphérique se retrouve à son tour éjecté et peut être récupéré par un détecteur.

Les électrons Auger possèdent une très faible énergie et sont caractéristiques de l'atome qui les a émis. Ils permettent ainsi d'obtenir des informations sur la composition de surface de l'échantillon, ainsi que sur le type de liaison chimique.

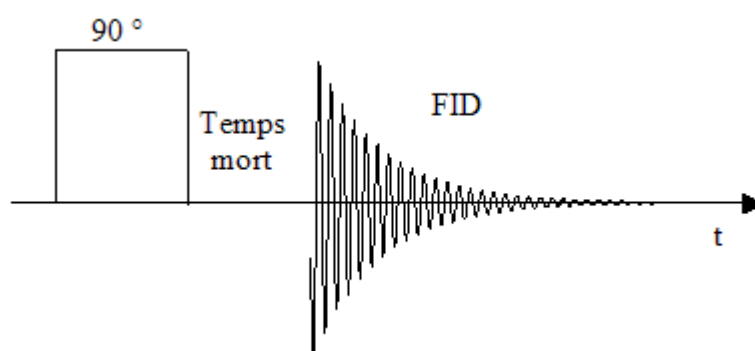
## Annexe 3 : Résonance Magnétique Nucléaire

### Signal temporel de précession libre (Free Induction Decay ou FID)<sup>1</sup>

Sitôt écarté de sa position d'équilibre, le vecteur moment magnétique est animé d'un mouvement de rotation autour du champ magnétique  $B_0$ . Ce mouvement de rotation est désigné sous le terme de précession. L'adjectif libre que l'on ajoute souvent fait référence à l'arrêt de la contrainte que représente l'impulsion d'excitation. La fréquence de ce mouvement de précession est égale à la fréquence de résonance de l'aimantation, donnée par la relation de Larmor.

### Séquence RMN simple

Il s'agit de la séquence la plus simple utilisée ; elle consiste en une seule impulsion de  $90^\circ$ , le FID est enregistré immédiatement après un temps mort lié à l'électronique. Le temps minimum entre deux séquences étant égal à environ cinq fois le temps de relaxation, temps nécessaire au rétablissement de l'aimantation selon z.

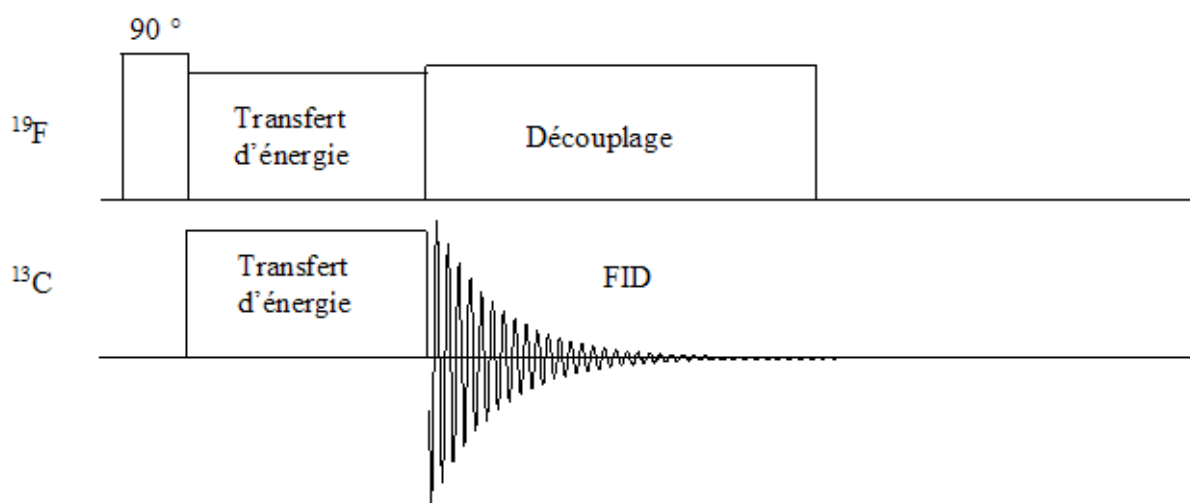


**Figure A3.1.** Représentation schématique de la séquence simple

<sup>1</sup> <http://jerome.giraudet.free.fr/recherchermn.htm>

### Séquence CP-MAS

Certains noyaux comme le proton  $^1\text{H}$  ou le fluor  $^{19}\text{F}$  possèdent une abondance élevée (100 % pour le fluor), par contre d'autres noyaux comme le carbone  $^{13}\text{C}$  ont une abondance extrêmement faible (1,1 %) ainsi qu'un  $T_1$  long. Ceci a pour conséquence un allongement très important du temps d'acquisition pour ce type de noyaux. La séquence de Polarisation Croisée (Cross-Polarisation) consiste à transférer l'aimantation du noyau abondant (I) vers le noyau peu abondant (S). La rotation à l'angle magique (MAS) permet de moyenner l'interaction dipolaire et supprime les composantes anisotropes du tenseur de déplacement chimique de sorte que seule une raie fine unique correspondant au déplacement chimique isotropique est alors présente. En réalité il apparaît dans le spectre des bandes de rotation écartées entre elles d'une valeur en Hz égale à la vitesse de rotation. Ces raies n'apparaissent que sur une largeur correspondant à la raie "statique". Si on utilise une vitesse suffisamment élevée on "repousse" les bandes de rotation à l'extérieur de la raie et elles disparaissent.



**Figure A3.2.** Représentation schématique de la séquence de Cross Polarisation (CP)

## Annexe 4 : Protocole de synthèse du SBF

Deux solutions distinctes (Ca-SBF et P-SBF) sont préparées dans ce protocole et c'est le mélange de ces deux solutions dans des proportions identiques qui nous permet d'obtenir le SBF. L'intérêt de ce protocole est de synthétiser deux solutions stables, pouvant être conservées quelques semaines, alors que le SBF ne peut être conservé que quelques jours<sup>1</sup>.

Pour chaque solution, environ 990 mL d'eau distillée sont chauffés dans un bécher au bain-marie et maintenus à 37°C pendant la durée de la synthèse. On ajoute alors les réactifs dans les proportions suivantes, sous agitation magnétique :

<b>Ca-SBF</b>	Masses (g)	<b>P-SBF</b>	Masses (g)
Tris : C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	6,057	Tris : C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	6,057
CaCl <sub>2</sub>	0,5549	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3 H <sub>2</sub> O	0,4566
MgCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,6095	NaHCO <sub>3</sub>	0,7056
		KCl	0,4473
		NaCl	16,1061

Rq : Tris : C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> correspond au trishydroxyméthylamine.

Le pH des deux solutions est ensuite amené à 7,4 par ajout de HCl 6N. Les solutions sont enfin transférées dans une fiole jaugée et le volume est complété à 1L. Après utilisation, les solutions sont stockées au réfrigérateur, à une température comprise entre 5 et 10°C.

<sup>1</sup> C. Combes, *Croissance cristalline de phosphates de calcium sur substrats d'intérêt biologique : le titane et le collagène*, 1996, Thèse, n° d'ordre 1189, INP Toulouse

